

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, 9/10, C07K 16/40, C12N 1/00, A01H 5/00 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29879 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Juni 1999 (17.06.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08001 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Dezember 1998 (09.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 54 622.6 9. Dezember 1997 (09.12.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON SCHAEWEN, Antje [DE/DE]; Natruper Strasse 169a, D-49076 Osnabrück (DE). (74) Anwalt: WIBBELMANN, Jobst; Wuesthoff & Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, D-81541 München (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. | |
| (54) Title: VEGETABLE <i>Gn1</i> SEQUENCES AND THE USE THEREOF TO OBTAIN PLANTS WITH A REDUCED OR LACK OF N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I (GnTI) ACTIVITY (54) Bezeichnung: PFLANZLICHE <i>Gn1</i> -SEQUENZEN UND VERWENDUNG DERSELBEN ZUR GEWINNUNG VON PFLANZEN MIT VERMINDERTER ODER FEHLENDER N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I (GnTI)-AKTIVITÄT (57) Abstract The invention relates to vegetable <i>Gn1</i> sequences, especially vegetable nucleic acid sequences coding the enzyme N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), DNA sequences derived therefrom including <i>Gn1</i> antisense and sense constructs, and the products thereof, antibodies directed against these translation products and to the use of sequence information to obtain transformed micro-organisms and transgenic plants including those with reduced or a lack of N-acetylglucosaminyl -transferase I activity. Such plants with a reduced or lack of N-acetylglucosaminyl -transferase I activity are highly important for the production of glycoproteins having a specific constitution in relation to sugar residues. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft pflanzliche <i>Gn1</i> -Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, davon abgeleitete DNA-Sequenzen einschließlich <i>Gn1</i> - <i>"antisense"</i> - und <i>"sense"</i> -Konstrukten, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung. | | | |

JC836 U.S. PRO
09/591466



06/09/00

Pflanzliche GntI-Sequenzen und Verwendung derselben zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität

Die Erfindung betrifft pflanzliche GntI-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, wie auch davon abgeleitete GntI-„antisense“- bzw. „sense“-Konstrukte, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

Stand der Technik:

In Eukaryonten werden Glykoproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) cotranslational (d.h. bei Import in das ER-Lumen) durch Verknüpfung von zunächst membrangebundenen Glykanen (an Dolicholpyrophosphat) mit spezifischen Asparagin-Resten in der wachsenden Polypeptidkette zusammengesetzt (N-Glykosylierung). In höheren Organismen unterliegen Zuckereinheiten, die an der Oberfläche der gefalteten Polypeptidkette liegen, in den Golgi-Zisternen weiteren Trimm- und Modifikationsreaktionen (Ref. 1). Durch verschiedene Glykosidasen und Glykosyltransferasen im ER werden zunächst typische $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Grundeinheiten des „high“-Mannose-Typs gebildet und anschließend bei Passage durch die verschiedenen Golgi-Zisternen in sogenannte „komplexe“ Glykane umgewandelt. Letztere zeichnen sich durch weniger Mannose-

Einheiten und den Besitz weiterer Zuckerreste, wie Fucose, Galaktose und/oder Xylose in Pflanzen bzw. Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure, NeuNAc) in Säugern, aus (Ref. 1,2,3). Das Ausmaß der Modifikationen ist von Glykoprotein zu Glykoprotein verschieden. Einzelne Polypeptidketten können heterogene Zuckerketten tragen. Zudem kann das Glykosylierungsmuster für ein bestimmtes Polypeptid variieren (gewebespezifische Unterschiede), und muß auch nicht immer bezüglich einer bestimmten Glykosylierungsstelle gleich sein, was als „Mikroheterogenität“ bezeichnet wird (Ref. 4,5). Die Rolle von Asparagin-ständigen Glykanen ist bislang kaum verstanden, was u.a. daraus resultiert, daß diese mehrere Funktionen erfüllen können (Ref. 6). Jedoch ist anzunehmen, daß beispielsweise der Schutz einer Polypeptidkette vor proteolytischem Abbau auch durch Glykane eines einfacheren Oligomannosyl-Typs gewährleistet werden kann (Ref. 7).

Problemstellung:

Glykoproteine sind für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Eine Isolierung von Glykoproteinen im Großmaßstab ist jedoch aufwendig und teuer. Die direkte Anwendung konventionell isolierter Glykoproteine ist oft problematisch, da einzelne Reste der Glykan-Komponenten bei Verabreichung als Therapeutikum ungewünschte Nebenwirkungen auslösen können. Dabei trägt die Glykan-Komponente vor allem zu den physikochemischen Eigenschaften (wie Faltung, Stabilität und Löslichkeit) der Glykoproteine bei. Des weiteren tragen isolierte Glykoproteine, wie bereits ausgeführt, selten einheitliche Zuckerreste, was als „Mikroheterogenität“ bezeichnet wird.

Hefen erweisen sich zur Gewinnung von Glykoproteinen für Medizin und Forschung als ungeeignet, da sie nur Glykosylierungen zum sogenannten „high“-Mannose-Typ durchführen können. Insekten und höhere Pflanzen zeigen zwar „komplexe“, aber von Tieren abweichende Glykoproteinmodifikationen. Aus Pflanzen isolierte Glykoproteine wirken deshalb in Säugern stark antigen. Tieri-

sche Organismen mit Glykosylierungsdefekten sind meist nicht lebensfähig, da die terminalen Glykan-Reste (beispielsweise membranständiger Glykoproteine) meist biologische Signalfunktion besitzen und vor allem für die Zell-Zellerkennung während der Embryonalentwicklung unentbehrlich sind. Es existieren zwar bereits Säugerzelllinien mit definierten Glykosylierungsdefekten, jedoch ist deren Kultivierung arbeitsintensiv und teuer.

Im Einzelnen wurden für Säuger auf Zellkulturebene bereits unterschiedliche Glykosylierungsmutanten beschrieben (Ref. 7,8,9,10). Diese Mutanten sind entweder in der Biosynthese reifer Oligosaccharidketten am Dolicholpyrophosphat oder in der Glykan-Prozessierung betroffen bzw. zeigen Abweichungen in ihren terminalen Zuckerresten. Einige dieser Zelllinien weisen einen konditional-lethalen Phänotyp auf oder zeigen Defekte im intrazellulären Proteintransport. Die Folgen dieser Defekte für den intakten Organismus sind schwer abschätzbar. Es wurde beobachtet, daß eine Veränderung im Muster komplexer Glykane auf Zelloberflächen von Säugern mit Tumor- und Metastasenbildung einhergeht, obwohl eine funktionale Beziehung noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Ref. 9). Glykosylierungsmutanten kommen in Säugern daher sehr selten vor. Diese unter HEMPAS (Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum lysis test) zusammengefaßten Defekte (Ref. 10,11) beruhen entweder auf einem Defizit von Mannosidase II und/oder niedrigen Gehalten des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase II (GnTII) und wirken sich stark einschränkend auf die Lebensfähigkeit des mutierten Organismus aus. *GntI*-"knock out"-Mäuse, in denen das Gen für GnTI zerstört wurde, sterben bereits „in utero“ an multiplen Entwicklungsdefekten (mündliche Mitteilung, H. Schachter, Toronto).

Für Pflanzen waren bis vor kurzem keine vergleichbaren Mutanten bekannt. Durch den Einsatz eines Antiserums, das spezifisch „komplex“-modifizierte Glykanketten pflanzlicher Glykoproteine erkennt und hauptsächlich gegen die hoch-antigenen $\beta 1 \rightarrow 2$ verknüpften Xylose-Reste gerichtet ist (Ref. 12), konnte die An-

melderin aus einer EMS-mutagenisierten F2-Population der genetischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* mehrere unabhängige Mutanten isolieren, die keine „komplexe“ Glykoproteinmodifikation mehr zeigten (complex glycan, *cgl*-Mutanten). Nach mindestens fünf Rückkreuzungen, jeweils gefolgt von intermittierenden Selbstungen (zum Wiederauffinden des rezessiven Defekts), wurden die Glykoproteine analysiert. Diese trugen hauptsächlich Glykane des $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Typs, was auf einen Defekt in N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) hindeutete (Ref. 8). Tatsächlich fehlte den *Arabidopsis cgl*-Mutanten GnTI-Aktivität (Ref. 13), welche normalerweise die erste Reaktion im Syntheseweg zu „komplex“ modifizierten Zuckerketten katalysiert (Ref. 1). Nach bisherigen Beobachtungen resultiert daraus allerdings keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der mutierten Pflanzen. In neueren Publikationen werden Pflanzen als mögliche Quelle zur Herstellung von pharmazeutisch relevanten Glykoproteinen oder Vakzinen vorgeschlagen (Ref. 14,15). Darin wird jedoch übersehen, daß aus Pflanzen isolierte Glykoproteine in Säugern starke Immunreaktionen auslösen können, was bisher einer Produktion heterologer Glykoproteine in Kulturpflanzen im Wege stand.

Pflanzen kommen weitgehend ohne „komplex“ modifizierte Glykoproteine aus, wie die Anmelderin am Beispiel der *Arabidopsis cgl*-Mutante zeigen konnte (Ref. 13). In der Mutante werden sekretorische Proteine im ER zunächst normal glykosyliert. Im Golgi-Apparat der *cgl*-Mutante bleiben die über Asparagin-Reste (N-Glykosylierung) an das Polypeptidrückgrat gebundenen Oligomannosylketten dann jedoch auf Stufe von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Resten stehen, da N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität fehlt (Fig. 1). Durch diesen Biosyntheseblock wird die pflanzenspezifische „komplexe“ Glykoproteinmodifikation und insbesondere die Anheftung von $\alpha 1 \rightarrow 3$ Fukose- und $\beta 1 \rightarrow 2$ Xylose-Resten verhindert, wodurch die stark antigene Wirkung auf den Säugerorganismus entfällt. Als krautige Pflanze besitzt *Arabidopsis* jedoch wenig verwertbare Biomasse. Zur Herstellung von biotech-

nologisch relevanten Glykoproteinen im Großmaßstab sind diese *cgl*-Pflanzen deshalb weniger geeignet. Als Alternative wären Kultursorten, insbesondere Solanaceen, wie z.B. Kartoffel, Tabak, Tomate oder Paprika, und des weiteren Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis, und Getreide, mit fehlender oder stark gedrosselter GnTI-Aktivität ideal zur Produktion von heterologen Glykoproteinen in Pflanzen. Dazu würden sich Verfahren des „homology-dependent gene silencing“ (Ref. 16,17) anbieten.

Wie Fig. 3 zeigt, ist die Homologie der ersten ermittelten pflanzlichen *GnTI*-Sequenz aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L., St) im Vergleich mit den entsprechenden bekannten Sequenzen aus tierischen Organismen außerordentlich niedrig (nur 30-40% Identität auf Proteinebene, vgl. Fig. 3A), so daß eine effiziente Drosselung der endogenen „komplexen“ Glykoproteinmodifikation in Pflanzen mittels „antisense“ bzw. „sense“-Suppression (Ref. 21) durch die Verwendung bereits bekannter heterologer *GnTI*-Gen-sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erreicht werden kann.

Für Medizin und Forschung besteht daher nach wie vor ein Bedarf, rekombinante Glykoproteine mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten in geeigneten Organismen kostengünstig herstellen zu können.

Wesen der Erfindung:

Nachdem die Anmelderin erstmals pflanzliche *GnTI*-cDNA-Sequenzen isolieren und aufklären konnte, ist es nun u.a. möglich, beliebige Pflanzen mit gedrosselter oder fehlender GnTI-Aktivität zu gewinnen, insbesondere herzustellen, bzw. entsprechende Mutanten durch revers-genetische Ansätze nach Transposon- (Ref. 18) bzw. T-DNA-Insertion (Ref. 19) aufzuspüren, um in diesen dann Glykoproteine mit niedrigem Antigenpotential zu produzieren.

i) Enzyme:

Die Erfindung umfaßt allgemein verschiedene N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme (EC 2.4.1.101) aus Pflanzen, z.B. aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) und *Arabidopsis thaliana*. Insbesondere betrifft die Erfindung die Enzyme, die die in Fig. 2 und 3B sowie in dem beigefügten Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen aufweisen oder enthalten.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner von den Aminosäuresequenzen der genannten Enzyme durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -modifikation oder durch C- und/oder N-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme, die, sofern sie enzymatische Aktivität zeigen, eine dem Ausgangsenzym vergleichbare Spezifität, also N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, sowie ggf. vergleichbare Aktivität aufweisen.

Unter einer vergleichbaren Aktivität wird im vorliegenden Zusammenhang eine Aktivität verstanden, die bis zu 100% über oder unter der Aktivität des Ausgangsenzyms liegt. Von der Erfindung sind dementsprechend auch abgeleitete Enzyme oder Proteine mit sehr geringer oder vollständig fehlender enzymatischer Aktivität, nachweisbar mittels eines oder mehrerer der nachfolgend angegebenen Tests, umfaßt. Zum Nachweis der Enzymaktivität dient ein Standard-Test, der mit Mikrosomen-Fractionen entweder radioaktiv, z.B. mit UDP-[6-³H]GlcNac als Substrat (Ref. 13), oder nicht-radioaktiv (HPLC-Methode; Ref. 20) durchgeführt wird. Pflanzliche GnTI-Aktivität kann subzellulär in Golgi-Fractionen nachgewiesen werden (Ref. 21). Enzymanreicherungen aus Pflanzen sind aufgrund der geringen Ausbeuten jedoch nahezu unmöglich.

Gegebenenfalls alternativ kann ein erfindungsgemäßes abgeleitetes Enzym als ein Enzym definiert werden, für das eine das Enzym kodierende DNA-Sequenz ermittelt oder abgeleitet werden

kann, die mit der das Ausgangsenzym kodierenden DNA-Sequenz bzw. der dazu komplementären Sequenz unter stringenten Bedingungen, wie sie nachfolgend definiert werden, hybridisiert.

Ein dergestalt abgeleitetes Enzym stellt beispielsweise eine Isoform dar, die die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 und 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt. Dieser Isoform fehlt u.a. der durch die Aminosäuren 10 bis 29 gebildete Membrananker, so daß diese Enzym-Isoform möglicherweise aufgrunddessen im Cytosol der Pflanze lokalisiert ist.

Als Beispiele für C- und/oder N-terminal verlängerte Proteine können Fusionsproteine genannt werden, die neben einer erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz ein weiteres Protein umfassen, das beispielsweise eine andersartige enzymatische Aktivität aufweist oder auf andere Weise, z.B. aufgrund von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz oder aufgrund einer Reaktivität mit spezifischen Antikörpern oder durch Binden an entsprechende Affinitätsmatrices, leicht nachweisbar ist.

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Fragmente der genannten Enzyme, die ggf. keine enzymatische Aktivität mehr aufweisen. Diese Fragmente zeigen in der Regel jedoch antigene Wirkung in einem damit immunisierten Wirt und können folglich als Antigen zur Erzeugung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Wirtes mit diesen eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyme insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die zugänglich sind aufgrund der Hybridisierung ihrer Gene oder eines oder mehrerer Abschnitte ihrer Gene

- mit einer oder mehreren der nachfolgend erläuterten erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmente und/oder
- mit geeigneten erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden, die ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hergestellt werden können.

Von der Erfindung umfaßt sind ferner nach den vorstehend erläuterten Maßgaben von diesen N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzymen abgeleitete Enzyme oder Proteine, einschließlich Fusionsproteinen von diesen, sowie Fragmente aller dieser Enzyme oder Proteine.

ii) Antikörper

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der vorstehend genannten Aminosäuresequenzen bzw. von antigen wirksamen Fragmenten davon zur Erzeugung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern oder -seren durch Immunisierung von Wirten mit diesen Aminosäuresequenzen bzw. Fragmenten sowie Antikörper bzw. -seren an sich, die die vorstehend erläuterten Enzyme und/oder Antigene spezifisch erkennen und binden. Die allgemeine Vorgehensweise und die entsprechenden Techniken zur Erzeugung polyklonaler und monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann gleichfalls wohlbekannt.

Beispielhaft wurde rekombinantes GntI-Protein aus *Solanum tuberosum* mit 10 N-terminalen Histidin-Resten („His-tag“) durch Verwendung eines Fragments der in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 dargestellten *GntI*-cDNA (Nukleotide 275 bis 1395) in *E. coli* überexprimiert und nach Affinitätsreinigung über eine Metall-Chelat-Matrix als Antigen zur Erzeugung von polyklonalen Antisera in Kaninchen eingesetzt (vgl. Beispiele 5 und 6).

Eine Anwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Antikörper besteht für das „Screenen“ von Pflanzen auf das Vorhandensein von N-Acetylglucosaminyltransferase I.

Eine Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers an pflanzliche(s) Protein(e) zeigt das Vorliegen eines mit diesem Antikörper nachweisbaren N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzyms an. In einem späteren Schritt kann dieser Antikörper darüber hinaus, in der Regel dann kovalent an einen Träger gebunden,

gegebenenfalls auch zur Anreicherung oder Reinigung des Enzyms mittels Säulenchromatographie eingesetzt werden.

Ein negatives Bindungsergebnis mit dem erfindungsgemäßen Antikörper, d.h. fehlende Bindung an die pflanzlichen Proteine, läßt wiederum auf ein fehlendes (oder durch Mutation stark verändertes) N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym und damit auf fehlende oder stark verminderte N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze schließen.

Techniken zum Ausführen der vorstehend angesprochenen „Screening“-Tests oder zur Enzymanreicherung bzw. -reinigung unter Einsatz von Antikörpersäulen oder anderen Affinitätsmatrices (vgl. Beispiele 5 und 6) sind dem Fachmann wohlbekannt.

iii) DNA-Sequenzen

Die Erfindung umfaßt ferner DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, einschließlich davon gemäß den vorstehenden Maßgaben abgeleitete Aminosäuresequenzen kodieren. Insbesondere betrifft die Erfindung das den in den Figuren 2 und 3B und im Sequenzprotokoll aufgeführten Aminosäuresequenzen jeweils zugrundeliegende Gen, und ganz besonders die in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNA-Sequenzen, sowie von diesen Genen und DNA-Sequenzen abgeleitete DNA-Sequenzen.

Unter abgeleiteten DNA-Sequenzen werden Sequenzen verstanden, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einzelnen oder mehreren und/oder kleineren Gruppen von Nukleotiden der vorstehend angegebenen Sequenzen und/oder durch Verkürzung oder Verlängerung am 5'- und/oder 3'-Ende erhalten werden. Die Modifizierungen innerhalb der DNA-Sequenz können zu abgeleiteten DNA-Sequenzen führen, die identische Aminosäuresequenzen verglichen mit der von der Ausgangs-DNA-Sequenz kodierten Aminosäuresequenz kodieren, oder aber auch zu solchen, bei denen einzelne oder einige wenige Aminosäuren gegenüber der Aminosäuresequenz, die die Ausgangs-DNA-Sequenz kodiert, verändert,

d.h. substituiert, deletiert und/oder insertiert sind, oder auch solchen, die - ggf. zusätzlich - C- und/oder N-terminal verkürzt und/oder verlängert sind.

Die Erfindung erstreckt sich gleichfalls auf die zu den erfindungsgemäßen Genen und DNA-Sequenzen komplementären Sequenzen sowie auf deren RNA-Transkriptionsprodukte.

Von der Erfindung umfaßt sind insbesondere sämtliche, nach den vorstehend angegebenen Maßgaben abgeleiteten Sequenzen, die unter stringenten Bedingungen mit den oben erläuterten Ausgangssequenzen oder den dazu komplementären Sequenzen oder Teilen davon hybridisieren, wie auch DNA-Sequenzen, die derartige Sequenzen umfassen.

Als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen im Sinne der Erfindung wird eine Hybridisierung bei Vorgehensweise gemäß einem oder mehreren der nachstehend angegebenen Verfahren verstanden. Hybridisieren: Bis zu 20 Std. in PEG-Puffer nach Church und Gilbert (0,25 M Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 1% (w/v) BSA, 7% (w/v) SDS, pH 7,5 mit Phosphorsäure; Ref. 22) bei 42°C oder in Standard-Hybridisierungspuffern mit Formamid bei 42°C oder ohne Formamid bei 68°C (Ref. 23). Waschen: 3-mal 30 min bei 65°C in 3-fach SSC-Puffer (Ref. 23), 0,1% SDS.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist der Begriff „Hybridisierung“ stets als Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wie vorstehend angegeben, zu verstehen, auch wenn dies im Einzelfall nicht explizit angegeben ist.

Darüberhinaus erstreckt sich die Erfindung auch auf Fragmente der vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen, einschließlich der nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen, auf von derartigen Fragmenten durch Nukleinsäuresubstitution, -insertion und/oder -deletion abgeleitete Fragmente sowie auf die entsprechenden Fragmente mit dazu komplementären Sequenzen. Derartige Fragmente sind u.a. als Sequenzierungs- oder PCR-

Primer, „Screening“-Sonden und/oder für Verwendungen, wie sie nachfolgend erläutert werden, geeignet. Für eine Verwendung als „Screening“- oder Hybridisierungssonde werden die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente häufig radioaktiv markiert eingesetzt. Fragmente mit Sequenzen, die von den vorstehend definierten Ausgangssequenzen durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden abgeleitet sind, bzw. die dazu komplementären Sequenzen sind in dem Umfange von der Erfindung umfaßt, als sie unter den vorstehend angegebenen stringenten Bedingungen mit den Ausgangssequenzen bzw. den dazu komplementären Sequenzen hybridisieren.

Erfindungsgemäße DNA-Fragmente können beispielsweise auf der Grundlage der im Sequenzprotokoll und in Figur 2 angegebenen DNA-Sequenzen ausgehend von pflanzlicher DNA mittels Restriktionsendonukleasen unter Nutzung geeigneter Restriktionsschnittstellen oder durch Einsatz von PCR mittels geeignet synthetisierter Primer erhalten oder alternativ auch chemisch synthetisiert werden. Derartige Techniken sind dem Fachmann wohlbekannt.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus auch jegliche DNA-Sequenzen, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die in ihrer Gesamtheit oder in einem Teilabschnitt

- mit einer der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder
- mit einem oder mehreren der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente und/oder
- mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Als DNA-Fragmente werden hierzu Hybridisierungs- oder „Screening“-Sonden eingesetzt, die üblicherweise mindestens 15 Nukleotide, typischerweise zwischen 15 und 30 Nukleotide, gegebenenfalls aber auch wesentlich mehr, umfassen. Es können dafür

beispielsweise die in Beispiel 1 eingesetzten Primer Verwendung finden. Alternativ können DNA-Sequenzen geeigneter Länge, abgeleitet von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen, eingesetzt werden. Als dritte Möglichkeit können geeignete erfindungsgemäße Hybridisierungssonden ausgehend von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes entwickelt werden.

In diesem Sinne sind Gegenstand der Erfindung auch N-Acetylglucosaminyltransferase I kodierende Gene, die insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten aufgrund ihrer Hybridisierung mit den vorstehend angegebenen Hybridisierungssonden aufgefunden werden können, sowie davon gemäß den vorstehend erläuterten Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, DNA-Fragmente und -Konstrukte.

Die Isolierung des jeweiligen Gens und die Sequenzierung desselben nach der Auffindung mittels der erfindungsgemäßen Hybridisierungssonden liegen im Bereich der Fähigkeiten eines Fachmanns auf diesem Gebiet und sind exemplarisch in den Beispielen für N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* und die entsprechenden Enzyme aus *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* erläutert.

Gegenstand der Erfindung sind schließlich auch „antisense“-Sequenzen bezüglich jeglichen vorstehend erläuterten DNA-Sequenzen.

iv) Konstrukte

Von der Erfindung werden auch Konstrukte umfaßt, die ggf. neben zusätzlichen 5'- und/oder 3'-Sequenzen, z.B. Linkern und/oder regulatorischen DNA-Sequenzen, oder andersartigen Modifikationen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, einschließlich der wie vorstehend ausgeführt abgeleiteten DNA-Sequenzen, umfassen.

Ein Beispiel hierfür sind Hybridisierungs- oder „Screening“-Sonden, die zusätzlich zu einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz noch ein in diesem Fall meist nichtradioaktives Nachweismittel für die Detektion von Hybridisierungsprodukten umfassen, z.B. fluoreszierende oder phosphoreszierende Moleküle, Biotin, Biotinderivate, Digoxigenin und Digoxigeninderivate. Es kommen in diesem Zusammenhang jedoch auch radioaktive oder nichtradioaktive Nachweismittel, die z.B. durch Endmarkierung an die erfindungsgemäße DNA-Sequenz angeheftet werden können, in Betracht.

Gegenstand der Erfindung sind auch „antisense“- und „sense“-Konstrukte bezüglich der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und -Fragmente, nämlich bezüglich

- der im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen und der zugrundeliegenden Gene,
- der davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleiteten DNA-Sequenzen,
- eines oder mehrerer Abschnitte dieser DNA-Sequenzen,
- DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten oder Pflanzenarten, die ein Gen darstellen oder Teil eines Gens sind, welches das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und die
 - mit einer der vorstehend genannten DNA-Sequenzen und/oder
 - mit einem oder mehreren der vorstehend genannten DNA-Fragmente und/oder
 - mit einer DNA-Sequenz, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist,

unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Des weiteren erstreckt sich die Erfindung auch auf jegliche DNA-Übertragungssysteme, wie Vektoren, Plasmide, Viren- und Phagen Genome oder Cosmide, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, z.B. das *GntI*-Gen, erfindungsgemäße cDNA und DNA-Abschnitte, wie sie im Sequenzprotokoll angegeben sind, Frag-

mente davon, insbesondere „antisense“- oder „sense“-Konstrukte und/oder davon nach den vorstehenden Maßgaben abgeleitete DNA-Sequenzen, enthalten.

Diverse Techniken zur Gewinnung oder Synthese erfindungsgemäßer DNA, DNA-Fragmente, Konstrukte und Übertragungssysteme, z.B. ausgehend von pflanzlicher DNA durch Restriktion mittels Restriktionsendonukleasen, PCR-Amplifizierung unter Einsatz geeigneter Primer, ggf. gefolgt von Klonierung und zusätzlicher chemischer oder enzymatischer Modifizierung, sind dem Fachmann wohlbekannt.

Eine Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden liegt im Nachweis von N-Acetylglucosaminyltransferase I-Genen in anderen Pflanzen als jenen, aus denen die im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen erhalten wurden, oder im Nachweis von möglichen (weiteren) Isoformen des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens in den Ausgangspflanzen *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana*.

Kann für das Hybridisierungsexperiment auf eine genomische Bank oder cDNA-Bank einer Pflanze zurückgegriffen werden, liefert ein positives Hybridisierungsergebnis bei einem derartigen „Screening“ oder Durchmustern der jeweiligen Bank den Hinweis auf einen Klon oder einige wenige Klone, die die gesuchte Sequenz, das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gen, vollständig oder teilweise in Verbindung mit nur einer begrenzten Menge weiterer DNA aus dem Genom der Zielpflanze enthalten, was die Klonierung und Sequenzierung des Zielgens entsprechend erleichtert. Alternativ kann ausgehend von pflanzlicher DNA und geeigneten Konstrukten, sogenannten PCR-Primern, auch eine PCR-Amplifikation des Gens oder von Teilen desselben vorgenommen werden, um Klonierung und Sequenzierung zu vereinfachen.

Ein Einsatz erfindungsgemäßer Sequenzierungsprimer, die ausgehend von geeigneten Abschnitten der erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert werden, ermöglicht z.B. eine genomische Sequen-

zierung ausgehend von der vollständigen, durch Restriktionsendonukleasen geschnittenen genomischen DNA einer Zielpflanze mittels der Church-Gilbert-Technik wie auch z.B. eine Sequenzierung auf cDNA-Ebene nach RT-PCR-Amplifikation der Gesamt-RNA der Zielpflanze (vgl. Bsp. 1).

Eine alternative Anwendungsmöglichkeit von erfindungsgemäßen DNA-Hybridisierungssonden, die von den im Sequenzprotokoll angegebenen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, besteht in der erfindungsgemäßen Verwendung derselben zum Nachweis von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Das Hybridisierungsexperiment dient zur Detektion des Gens der N-Acetylglucosaminyltransferase I (*GntI*) und erlaubt z.B. aufgrund eines negativen Hybridisierungsergebnisses unter stringenten Bedingungen den Rückschluß auf ein Fehlen des *GntI*-Gens und damit fehlende N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in einer untersuchten Pflanze.

Derartige Hybridisierungstechniken zum Nachweis von Proteinen oder Genen insbesondere in Pflanzenmaterial mittels DNA-Sonden sind dem Fachmann ebenfalls geläufig. Es wird in diesem Zusammenhang auf die vorstehenden Ausführungen zu möglichen Hybridisierungsbedingungen unter Punkt iii) verwiesen. Geeignete DNA-Hybridisierungssonden umfassen in der Regel mindestens 15 Nukleotide mit einer Sequenz, die z.B. von den in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen oder den entsprechenden *GntI*-Genen abgeleitet ist.

v) Transformierte Mikroorganismen

Die Erfindung erstreckt sich des weiteren auf Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Bakteriophagen, Viren, einzellige eukaryotische Organismen, wie Pilze, Hefen, Protozoen, Algen und humane, tierische und pflanzliche Zellen, die durch eine oder mehrere der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Konstrukte, wie vorstehend erläutert, transformiert wurden.

Verwendung finden erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen beispielsweise als Expressionssysteme für die transformierende Fremd-DNA zur Gewinnung der entsprechenden Expressionsprodukte. Typische Mikroorganismen für diese Zwecke sind Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*. Des weiteren können erfindungsgemäße transformierte Mikroorganismen, insbesondere Agrobakterien, z.B. zur Transformation von Pflanzen unter Weitergabe der transformierenden Fremd-DNA eingesetzt werden.

Verfahren zur Transformation von Mikroorganismenzellen durch (Fremd-)DNA sind dem Fachmann wohlbekannt.

Hierfür werden z.B. als Expressionsvektoren bezeichnete Konstrukte eingesetzt, die die erfindungsgemäße DNA-Sequenz unter Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten, um eine Expression der eingeschleusten DNA in der Ziel- oder Wirtszelle zu ermöglichen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Enzyme und Proteine unter Einsatz eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen transformierten Mikroorganismen. Das Verfahren umfaßt, mindestens einen durch erfindungsgemäße DNA, insbesondere eine der im Sequenzprotokoll angegebenen cDNAs, unter Kontrolle eines aktiven Promotors transformierten Mikroorganismus, wie vorstehend definiert, zu züchten und das erfindungsgemäße Enzym aus den Mikroorganismen und gegebenenfalls auch dem Kulturmedium zu isolieren. Das Verfahren erstreckt sich selbstverständlich auch auf die Gewinnung von den erfindungsgemäßen Enzymen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* abgeleiteten Enzymen bzw. Proteinen, wie sie vorstehend unter i) definiert sind.

Verfahren zur Züchtung transformierter Mikroorganismen sind dem Fachmann wohlbekannt. Die Isolierung des exprimierten Enzyms

kann beispielsweise gemäß dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren mittels Metall-Chelat-Chromatographie oder alternativ durch Chromatographie an Säulen, die gegen das Enzym gerichtete Antikörper an das Packungsmaterial gebunden enthalten, erfolgen.

vi) Transgene Pflanzen

Die Erfindung umfaßt gleichfalls transgene Pflanzen, die mittels einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. eines entsprechenden Konstrukts transformiert worden sind. Es können so z.B. transgene Pflanzen erhalten werden, bei denen eine GnTI-Defizienz, z.B. aufgrund eines fehlenden oder schadhaften *GnTI*-Gens oder aufgrund von Defekten in den regulatorischen Bereichen dieses Gens, durch Komplementierung durch ein von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen abgeleitetes Konstrukt, dessen Expression unter Kontrolle eines aktiven konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors steht, beseitigt worden ist. Das aufgrund der in dem Konstrukt enthaltenen erfindungsgemäßen DNA exprimierte GnTI-Enzym oder Protein mit GnTI-Aktivität komplementiert in diesem Falle die in der Ausgangspflanze fehlende GnTI-Aktivität.

Gleichfalls in Betracht gezogen werden transgene Pflanzen, in denen die in der Ausgangspflanze bereits vorhandene GnTI-Aktivität durch zusätzliche Expression des durch ein erfindungsgemäßes Konstrukt eingeschleusten *GnTI*-Transgens erhöht ist. Ein bei der Untersuchung des Enzyms N-Acetylglucosaminyltransferase I in Pflanzen bestehendes Hauptproblem war bislang die überaus geringe Expression des *GnTI*-Gens *in vivo*, verbunden mit einer überaus geringen Enzymaktivität, die entsprechend schwer nachzuweisen war. Durch Coexpression einer erfindungsgemäßen DNA kann das Problem zu geringer GnTI-Enzymaktivität bei Pflanzen behoben werden.

In diesem Falle kann es bevorzugt sein, für die Transformation von Pflanzen erfindungsgemäße DNA einzusetzen, die zusätzlich

einen Sequenzabschnitt umfaßt, der nach Expression eine vereinfachte Detektierung und/oder Anreicherung bzw. Reinigung des Proteinproduktes mit GnTI-Aktivität ermöglicht. Beispielsweise gelingt dies durch Einsatz einer speziellen DNA-Sequenz für die Expression eines rekombinanten GnTI-Enzyms, die eine N- oder C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker kodiert. Ist zusätzlich ein Aminosäuresequenzabschnitt zwischen GnTI-Enzym und Affinitätsmarker vorgesehen, der eine Erkennungsstelle für eine spezifische Protease darstellt, kann durch nachträglichen Einsatz dieser spezifischen Protease die N- oder C-terminale Sequenzverlängerung von dem GnTI-Enzym abgespalten und das GnTI-Enzym dadurch isoliert erhalten werden.

Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die das rekombinante GnTI-Enzym mit einer C-terminalen Sequenzverlängerung, die den Affinitätsmarker AWRHPQFGG („Strep-tag“; Ref. 39) kodiert, und einer dazwischenliegenden Protease-Erkennungsstelle, IEGR, kodiert. Die Expression der erfindungsgemäßen DNA liefert GnTI-Enzyme mit der angegebenen C-terminalen Sequenzverlängerung, über welche die exprimierten Proteinmoleküle spezifisch an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix binden und so isoliert werden können. Mittels der die Aminosäuresequenz IEGR spezifisch erkennenden Protease Faktor Xa kann der GnTI-Anteil der Proteinmoleküle dann freigesetzt werden. Alternativ kann das vollständige Protein von der Streptavidin-derivatisierten Matrix mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden.

Ein weiteres Beispiel stellen erfindungsgemäße DNA-Sequenzen dar, die ein Protein kodieren, das zusätzlich zu einem GnTI-Enzym eine Mehrzahl, z.B. 10, N-terminal angefügte Histidin-Reste („His-tag“) umfaßt. Eine Isolierung bzw. Reinigung der exprimierten Proteine kann aufgrund der N-terminalen Histidin-Reste leicht durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (z.B. Ni-Sepharose) erfolgen (vgl. auch Beispiel 5).

Die Erfindung umfaßt gleichfalls Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der vorstehend erläuterten Sequenzinformation zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

Die Möglichkeiten zum Auffinden von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufgrund eines Gendefektes oder fehlenden Gens durch Einsatz erfindungsgemäßer Antikörper oder erfindungsgemäßer „Screening“- oder Hybridisierungssonden wurden vorstehend bereits beschrieben.

Zwei weitere Möglichkeiten bestehen in der erfindungsgemäßen Verwendung von „antisense“- bzw. „sense“-DNA-Konstrukten, die von der DNA-Sequenz eines *GntI*-Gens einer Pflanze abgeleitet sind, zur Erzeugung transgener Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität mittels „homology-dependent gene silencing“ (vgl. Ref. 16,17). Die DNA-Sequenz, auf die zur Erzeugung der Konstrukte als Ausgangssequenz zurückgegriffen wird, kann dabei von der zu transformierenden Ausgangspflanze selbst oder aber auch von einer anderen Pflanzenvarietät oder -art stammen. Insbesondere finden „antisense“- oder „sense“-Konstrukte, wie sie vorstehend unter den Punkten iii) und iv) erläutert wurden, Verwendung. Die eingesetzten Konstrukte umfassen üblicherweise mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare.

Insbesondere umfassen die hierfür eingesetzten Konstrukte mindestens 50 bis 200 und mehr Basenpaare mit einer Sequenz, die ausgehend

- von den im Sequenzprotokoll angegebenen cDNA-Sequenzen und/oder den entsprechenden *GntI*-Genen und/oder

- von den vorstehend erläuterten erfindungsgemäßen abgeleiteten DNA-Sequenzen und/oder DNA-Fragmenten und/oder
- von DNA-Sequenzen insbesondere aus anderen Varietäten und Pflanzenarten, die N-Acetylglucosaminyltransferase I kodieren und aufgrund einer Hybridisierung mit Hybridisierungs- oder „Screening“-Sonden, wie sie vorstehend unter Punkt iii) und iv) definiert wurden, unter stringenten Bedingungen aufgefunden werden können, abgeleitet wird.

Die Konstrukte enthalten in der Regel einen starken konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotor, unter dessen Kontrolle die „antisense“- oder „sense“-DNA-Sequenzabschnitte stehen.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von „antisense“-Konstrukt(en) in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch „antisense“-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription des „antisense“-Konstrukts oder der „antisense“-Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe ist beabsichtigt, auf RNA-Ebene eine Hybridisierung von Transkripten des *GntI*-Gens mit Transkripten des „antisense“-DNA-Abschnitts zu erzielen, die die Translation der *GntI*-mRNA verhindert. Die Folge ist eine transgene Pflanze mit stark verringerten Gehalten an N-Acetylglucosaminyltransferase I und damit einer stark verringerten entsprechenden Enzymaktivität.

Für die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen mit „antisense“-Konstrukten können beispielsweise Konstrukte eingesetzt werden, die mit einer der kompletten, in Fig. 2 und im Sequenzprotokoll aufgeführten cDNAs oder entsprechenden, in der Regel mindestens 50 bis über 200 Basenpaare umfassenden Abschnitten derselben hybridisieren. Insbesondere bevorzugt ist darüberhinaus die Verwendung von Fragmenten, deren Transkripte zusätzlich zu einer Hybridisierung mit einem Teil des 5'-untranslatierten Bereiches der *GntI*-mRNA führen, an dem oder in

dessen Nähe sich normalerweise die Anheftung der Ribosomen vollziehen würde. Beispiele für derartige Konstrukte sind in Fig. 4 gezeigt.

Angeichts des Vorkommens einer Isoform in *Solanum tuberosum* mit wahrscheinlich cytoplasmatischer Lokalisierung aufgrund des fehlenden Membranankers (As 10 bis 29) mit noch unbekannter Funktion kann es wünschenswert sein, lediglich das N-Acetylglucosaminyltransferase I-Enzym zu erfassen, das in den Golgi-Zisternen lokalisiert ist, d.h. nur jenes Enzym, das den Membrananker umfaßt. Ein Grund für diesen Wunsch kann das Bestreben oder im Einzelfalle auch die Notwendigkeit sein, den cytoplasmatischen Metabolismus der Pflanzenzelle, für den die cytoplasmatische N-Acetylglucosaminyltransferase I womöglich von Bedeutung ist, so wenig als möglich zu beeinträchtigen. Zu diesem Zweck können erfindungsgemäß „antisense“-Konstrukte eingesetzt werden, die bzw. deren Transkripte mit einem DNA- oder RNA-Abschnitt des *GntI*-Gens oder der *GntI*-mRNA hybridisieren, der einen Teil des 5'-untranslatierten Bereichs und den kodierenden Bereich - einschließlich des Membranankers - umfaßt. Eine Erstreckung des Hybridisierungsbereiches bis Position 266 der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1 wird in der Regel für den genannten Zweck als unschädlich erachtet.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen durch Integration von „sense“-Konstrukten in das Pflanzengenom oder durch virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch „sense“-Konstrukt(e) enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des oder der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe wird in Anlehnung an die Arbeiten von Faske et al. (Ref. 17) in Tabak von Hybridisierungsphänomenen dieser Konstrukte mit dem endogenen *GntI*-Gen auf posttranskriptionaler bzw. auf DNA-Ebene ausgegangen, die letztlich die Translation des *GntI*-Gens beeinträchtigen oder verhindern. Das Resultat sind auch in diesem Falle transgene Pflanzen mit verminderter oder sogar fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität.

Verfahren zur stabilen Integration derartiger „antisense“- und „sense“-Konstrukte in das Genom von Pflanzen bzw. zur viralen Infektion von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression derartiger Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe sind dem Fachmann bekannt. Dazu gehören sowohl der direkte DNA-Transfer (z.B. in Protoplasten mittels Elektroporation oder durch Zusatz eines hochmolekularen Osmotikums sowie biolistische Methoden, bei denen DNA-umhüllte Teilchen in Pflanzengewebe geschossen werden) wie die Verwendung natürlicher Wirt/Vektor-Systeme (z.B. Agrobakterien oder Pflanzenviren). Für eine virale Infektion von Ausgangspflanzen oder -pflanzenzellen durch entsprechende Konstrukte enthaltende Viren für eine extrachromosomale Propagation und Transkription/Expression der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe stehen eine Reihe spezieller Viren, wie Tabakmosaikvirus (TMV) oder Kartoffelvirus X (potato virus X), zur Verfügung.

Beispielhafte Pflanzen, die für eine derartige Integration in Frage kommen, umfassen dikotyledone wie monokotyledone Kulturpflanzen, insbesondere Solanaceen wie Kartoffel, Tabak, Tomate und Paprika. Zusätzlich wären Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide geeignete Zielpflanzen für den Einsatz homologer „antisense“-Konstrukte. Beispielsweise erscheint die im Sequenzprotokoll angegebene Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* insbesondere als Ausgangssequenz für die erfindungsgemäße Transformation von Brassicaceen, wie z.B. Rapspflanzen, mittels „sense“- oder „antisense“-Konstrukten geeignet. Weitere Pflanzen von Interesse sind jegliche Pflanzen, die für Medizin und Forschung interessante Glykoproteine exprimieren.

Allgemein soll festgehalten werden, daß die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen, die in dem entsprechenden Bereich des *GntI*-Gens eine Homologie von $\geq 70\%$ auf Nukleotidebene zu den eingesetzten erfindungsgemäßen „antisense“- oder „sense“-

Konstrukten aufweisen, in der Regel zu erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen führt, die die gewünschte Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit wird ferner in einer zielgerichteten Zerstörung („Knock out“) des N-Acetylglucosaminyltransferase I-Gens durch „gene targeting“ mittels homologer Rekombination (Ref. 24) in einer Zielpflanze durch Einsatz eines geeigneten, von der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenz abgeleiteten DNA-Fragments gesehen, ähnlich der Vorgehensweise, wie sie beispielsweise für Hefe-Systeme und Säuger etabliert worden ist.

Die Erfindung umfaßt ferner transgene Pflanzen, die mit den vorstehend angesprochenen „antisense“- oder „sense“-Konstrukten bzw. mit diese enthaltenden Viren transformiert worden sind, sowie Teile derartiger transgener Pflanzen, entsprechend transformierte Pflanzenzellen, transgene Samen und transgenes Vermehrungsmaterial.

Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, z.B. durch Agrobakterien- oder Virus-vermittelten, wie auch direkten DNA-Transfer, sind dem Fachmann geläufig. Hinsichtlich beispielhafter Pflanzen für eine derartige Transformation gilt das vorstehend ausgeführte.

Die erfindungsgemäßen bzw. erfindungsgemäß gewonnenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität können erfindungsgemäß zur Herstellung von Glykoproteinen mit minimalen und einheitlichen, also definierten Zuckerresten eingesetzt werden. Wie bereits erläutert, sind derartige Glykoproteine für Medizin und Forschung von großer Bedeutung. Als preiswerte Rohstoff- und Nahrungsquelle sowie durch ihre problemlose Entsorgung über Kompostierung stellen Pflanzen per se ideale Bioreaktoren dar. Gemäß der vorstehend erläuterten Erfindung können jetzt biotechnologisch oder pharmazeutisch relevante Glykoproteine (z.B. Therapeutika mit niedrigem Antigenpotential für Säuger) in Kulturpflanzen exprimiert

werden, in denen GnTI-Aktivität stark gedrosselt ist oder vollständig fehlt.

Die Erfindung umfaßt dementsprechend auch ein Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze, von Teilen derartiger Pflanzen oder von erfindungsgemäßen transformierten Pflanzenzellen, die jeweils das gewünschte Glykoprotein exprimieren, und das Isolieren des gewünschten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material.

Beispielhafte Kulturpflanzen sind in diesem Zusammenhang Solanaceen, insbesondere Kartoffel, Tabak, Tomate, und Paprika. Des weiteren kommen Banane, Luzerne, Raps, Rüben, Soja, Salat, Mais, Reis und Getreide in Frage.

Die Sequenz der enzymatisch gesteuerten, pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen, ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Die Blockierung der Biosynthese durch fehlende oder unzureichende N-Acetylglucosaminyltransferase I-(GlcNac-Transferase I)-Aktivität in einer Pflanze führt dazu, daß anstelle „komplexer“ Glykane hauptsächlich Glykane des $\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$ -Typs, also Glykoproteine mit einheitlichen und wohldefinierten Zuckerresten gebildet werden, die für Medizin und Forschung von überaus hoher Bedeutung sind.

Hierzu können die Gene für die gewünschten Glykoproteine in ihren natürlichen Erzeugerpflanzen exprimiert werden, die erfindungsgemäß z.B. mittels „antisense“- oder „sense“-Konstrukten zu transgenen Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität transformiert wurden.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, erfindungsgemäße transgene Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität einzusetzen, die zusätzlich mit

dem Gen für das gesuchte Glykoprotein transformiert worden sind. Hierzu können Konstrukte eingesetzt werden, die das Gen für das gesuchte Glykoprotein unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven oder induzierbaren, ggf. zusätzlich gewebespezifischen Promotors enthalten und die zu einer Integration des Gens in das Genom der Pflanze führen. Alternativ kann die Transformation auch durch virale Infektion durch ein das Gen für das gesuchte Glykoprotein enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression des Gens erfolgen. Das Glykoprotein kann dann in der jeweiligen Wirtspflanze exprimiert und daraus gewonnen werden.

Es kann dabei selbstverständlich alternativ auch so vorgegangen werden, daß zunächst eine Transformation mit einem Expressionskonstrukt oder Virus, das die kodierende DNA des Glykoproteins enthält, vorgenommen wird und erst danach eine weitere Transformation mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen „antisense“- oder „sense“-Konstrukten oder einem oder mehreren Viren, die entsprechende DNA enthalten, erfolgt. Eine gleichzeitige Transformation mit beiden Konstrukten oder mit einem Virus, das sowohl das „antisense“- oder „sense“-Konstrukt als auch das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthält, ist ebenfalls möglich („Huckepack“-Version).

Im Rahmen der Erfindung wird auch eine virale Überinfektion erfindungsgemäßer transgener Pflanzen, bei denen bereits eine Integration des „antisense“/„sense“-Konstrukts und/oder des das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gens im Genom vorliegt, durch Viren, die „antisense“/„sense“-Konstrukt und/oder das das gesuchte Glykoprotein kodierende Gen enthalten, für eine zusätzliche extrachromosomale Propagation und Transkription bzw. Expression dieser DNA in Betracht gezogen. Hierdurch können die Konzentrationen an „antisense“- bzw. „sense“-DNA oder exprimiertem Glykoprotein in den transgenen Pflanzenzellen erhöht werden.

Für die erfindungsgemäße Gewinnung definiert glykosylierter Glykoproteine kann sich eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren beispielsweise in Fällen als sinnvoll erweisen, wenn beabsichtigt ist, die gewünschten Glykoproteine nur aus bestimmten Pflanzenteilen, wie der Knolle oder den Wurzeln, zu gewinnen. Für eine ganze Reihe von Pflanzengeweben stehen heute gewebespezifische Promotoren zur Verfügung, die eine Expression von Fremdgenen speziell nur in diesen Geweben bewirken. Beispielsweise können hier knollenspezifische Promotoren, wie Pata-tin Klasse I- (Ref. 26) und Proteinase Inhibitor II-Promotoren (Ref. 27) aufgeführt werden. Beide Promotoren zeigen unter bestimmten Bedingungen ebenfalls Expression in Blattgewebe, d.h. können durch hohe Metabolitgehalte (wie z.B. Saccharose) und im Fall des Proteinase Inhibitor II-Promotors auch durch mechanische Verwundung oder Besprühen mit Abscisin- bzw. Jasmonsäure induziert werden.

Eine Verwendung gewebespezifischer Promotoren kann auch dann angezeigt sein, wenn sich die für die Transformation eingesetzte erfindungsgemäße DNA-Sequenz bzw. deren Transkriptions- oder Translationsprodukte für bestimmte Pflanzenteile als abträglich erweisen, z.B. durch negative Einwirkung auf den Metabolismus der entsprechenden Pflanzenzellen.

Als beispielhaftes Ziel-Glykoprotein kommt humane Glucocerebrosidase zur Therapie der erblichen „Gaucher“-Krankheit (Ref. 25) in Frage. Zur Gewinnung von humaner Glucocerebrosidase (GC) mit einheitlichen und definierten Zuckerresten können beispielsweise erfindungsgemäße mittels „antisense“-DNA transformierte Pflanzen mit dem Gen für humane Glucocerebrosidase transformiert werden. Dafür wird die cDNA-Sequenz für humane Glucocerebrosidase (Ref. 38) mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer am 3'-Ende so modifiziert, daß das rekombinante Enzym eine C-terminale Sequenzverlängerung trägt, die einen Affinitätsmarker (z.B. AWRHPQFGG, „Strep-tag“; Ref. 39) und gegebenenfalls auch eine Protease-Erkennungsstelle (z.B. IEGR) zwischen GnTI-Enzymabschnitt und Affinitätsmarker kodiert. Die so

veränderte GC-cDNA-Sequenz wird unter Verwendung eines starken und ggf. gewebespezifischen Promotors (z.B. für Kartoffel unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Patatin-Promotors) in erfindungsgemäßen *GntI*-antisense-Pflanzen exprimiert, so daß das in diesen Pflanzen synthetisierte Enzym ausschließlich wohldefinierte N-Glykane trägt. Der Affinitätsmarker soll die Anreicherung des rekombinanten Enzyms aus den transgenen Pflanzen erleichtern. In diesem Falle binden die exprimierten Proteinmoleküle („GC-Strep“-Moleküle) über die Affinitätsmarkersequenz an eine Streptavidin-derivatisierte Matrix und können von dieser mittels Biotin oder Biotinderivaten abgelöst werden. Die Ablösung von der Streptavidin-derivatisierten Matrix kann auch mittels katalytischer Mengen einer Protease erfolgen, die eine Spezifität für die zwischen dem *GnTI*-Enzymabschnitt und dem Affinitätsmarker befindliche Protease-Erkennungsstelle aufweist. In diesem Falle wird nur der *GnTI*-Enzymabschnitt von der Matrix abgelöst. Dies kann insbesondere in dem Falle von Vorteil sein, wenn die Affinitätsmarkersequenz eine nachteilige Wirkung auf die *GnTI*-Aktivität ausübt.

Die $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Glykane der aus den erfindungsgemäßen Pflanzen gewonnenen Glucocerebrosidase werden aufgrund ihrer terminalen Mannose-Reste von Makrophagen als Aufnahmesignal erkannt und können daher direkt zur Therapie der erblichen „Gaucher-Krankheit“ eingesetzt werden. Eine Therapie ist derzeit nur durch aufwendige Isolierung und Deglykosylierung nativer Glucocerebrosidase möglich (Ref. 25).

Die Herstellung rekombinanter Glykoproteine läßt sich dementsprechend durch den Einsatz pflanzlicher *GntI*-Sequenzen im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, z.B. der technisch aufwendigen chemischen Deglykosylierung gereinigter Glykoproteine (Ref. 25) oder einer schwierigen und teuren Produktion in *GnTI*-defizienten tierischen Zelllinien (Ref. 7,10), stark vereinfachen.

Erläuterung der Figuren:

Fig. 1: Sequenz der pflanzenspezifischen N-Glykan-Modifikationen, denen sekretorische Glykoproteine bei Passage durch den Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterliegen (Ref. 28). Der Biosyntheseblock zu „komplex“-modifizierten Glykanen beruht auf einem Defizit an GnTI-Aktivität (hervorgerufen entweder durch defektes oder fehlendes GnTI-Enzym oder durch effektive Drosselung der *GntI*-Genexpression) und ist durch ein Kreuz markiert. Bedeutung der Symbole: (F) Fucose-Reste, (X) Xylose-Reste, (●) GlcNac-Reste, (□) Mannose-Reste.

Fig. 2: Vollständige cDNA-Sequenz einer pflanzlichen GnTI aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) und davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Exemplarisch ist die vollständige cDNA der *GntI*-Isoform mit Membrananker aus Kartoffelblattgewebe (A1) dargestellt. Die EcoRI/NotI-Linker an den 5'- und 3'-Enden der cDNA sind durch Fettdruck hervorgehoben, die Bindestellen der für die RT-PCR-Sonde verwendeten degenerierten Oligonukleotide sind unterstrichen. Im Gegensatz zu bereits publizierten tierischen GnTI-Sequenzen enthält die abgeleitete Proteinsequenz der Kartoffel cDNA-Klone eine potentielle N-Glykosylierungsstelle: Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr, die mit einem Stern markiert ist. Die Region des Membranankers ist kursiv hervorgehoben (As 10 bis 29). Der Beginn der möglicherweise im Cytosol lokalisierten Isoform (A8) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Fig. 3: A, Identitäts- bzw. Ähnlichkeitsgrad der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer vollständigen *GntI*-cDNA-Sequenz aus Kartoffel (A1) im Vergleich mit anderen, aus Datenbanken ausgewählten GnTI-Sequenzen tierischer Organismen. Identische Aminosäurepositionen (in %) sind fett gedruckt, ähnliche Aminosäurepositionen stehen in Klam-

mern darunter. Bedeutung der Kürzel: Hu, Mensch; Ra, Ratte; Mo, Maus; Ce, *Caenorhabditis elegans* (Spulwurm); St, *Solanum tuberosum* (Kartoffel).

B, Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher *GntI*-cDNA-Klone. A_Stb-A1, *GnTI* aus Kartoffelblatt; B_Ntb-A9, *GnTI* aus Tabakblatt (A9); C_Atb-Full, *GnTI* aus *Arabidopsis thaliana*. Identische As sind schwarz, ähnliche As hellgrau markiert.

Fig. 4: Klonierungsschema der verwendeten *GntI*-„antisense“-Konstrukte. In die *SalI*-Schnittstelle der Polylinkerregion des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein *NotI*-Linker eingeführt (= pA35N) und die vollständige A1-*GntI*-cDNA über *NotI* in pA35N inseriert. Das entsprechende „antisense“-Konstrukt (= pA35N-A1as) wurde über *EcoRI* und *HindIII* in den binären Vektor pBin19 (Ref. 30) inseriert. Des weiteren wurde nach PCR-Amplifikation ein ca. 270 Bp umfassendes 5'-Fragment der A1-*GntI*-cDNA über *XbaI*- und *NotI*-Schnittstellen in pA35N in „antisense“-Orientierung kloniert (= pA35N-A1-kurz) und ebenfalls in pBin19 inseriert. Abkürzungen: Zahlen in Klammern, Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen in der A1-*GntI*-cDNA (in Basenpaaren); pBSK, Klonierungsvektor (Stratagene); pGEM3Z, Klonierungsvektor (Promega); CaMV p35S, konstitutiver Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotor; OCSpA, Octopinsynthase-Polyadenylierungssignal; pNOS, Nopalinsynthase-Promotor; NEO, Neomycinphosphotransferase (Selektionsmarker, vermittelt Kanamycinresistenz); NOSpA, Nopalinsynthase-Polyadenylierungssignal; LB/RB, „left/right border“ der T-DNA des binären Vektors; Pfeil, Translationsstart (ATG); A8, Beginn der potentiell cytosolisch lokalisierten *GntI*-Isoform (7 As-Austausche im Vergleich zu A1).

Fig. 5: Ausmaß der Suppression komplexer Glykoprotein-Modifikation in transgenen Kartoffelpflanzen, die mit dem langen *GntI*-"antisense"-Konstrukt (vgl. Fig. 4) transformiert wurden. A, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Blattextrakten; B, "Western-Blot"-Analyse (Ref. 13,33) von Parallelproben mit einem "complex-glycan"-Antiserum (Ref. 12,13). Die Spuren enthalten je 30 µg Gesamtprotein: *cgl*(Ara), Arabidopsis *cgl*-Mutante (Ref. 13); WT(Desi), Kartoffel Wildtyp; die Nummern bezeichnen einzelne transgene Kartoffelpflanzen, die Pfeile Molmassenstandards von 66, 45, 36 und 29 kD.

Fig. 6: Nachweis der Spezifität des erzeugten GnTI-Antiserums nach Zellfraktionierung (Ref. 40) von Tabak-Kallusmaterial. Für die "Western Blot"-Analyse (Ref. 13, 33) wurden pro Spur je 30 µg Protein aufgetragen. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Spur 1, Homogenat nach Abtrennung von Zelltrümmern; Spur 2, Vesikel-Fraktion nach Säulenchromatographie; Spur 3, Saccharose-Gradient-Fraktion I (Mikrosomen); Spur 4, Saccharose-Gradient-Fraktion II (Plastiden); Spur 5, für die Immunisierung verwendetes Antigen (rekombinantes GnTI-Fusionsprotein; Pfeil, Molmasse von ca. 49 kD.

Erläuterung der im Text verwendeten Abkürzungen:

As, Aminosäure(n); Bp, Basenpaar(e); EMS, Ethylmethansulfonat (mutagene Chemikalie); F2, zweite Filialgeneration; Fuc, Fucose; Glc, Glucose; GlcNac, N-Acetylglucosamin; GnTI, N-Acetylglucosaminyltransferase I (EC 2.4.1.101); *GntI*, Gen für GnTI (Kern-codiert); kD, Kilodalton; Man, Mannose; PCR, Polymerasekettenreaktion; PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese; Ref., Referenz; RT-PCR, Reverse Transkription gekoppelt mit Polymerasekettenreaktion; SDS, Natriumdodecylsulfat; Var., Varietät; Xyl, Xylose.

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen eingehender erläutert. Die Beispiele werden lediglich zur Veranschaulichung der Erfindung aufgeführt und beschränken die Erfindung in keiner Weise.

Bsp. 1: Isolierung und Charakterisierung von pflanzlichen *GntI*-cDNA-Klonen.

Aus Kartoffel- und Tabak-Blattgewebe wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR in Kombination mit degenerierten Primern (Vorgehen analog zu Ref. 31), die von konservierten Aminosäurebereichen bekannter *GnTI*-Sequenzen aus tierischen Organismen abgeleitet wurden („sense“-Primer 1*, 5'-TG(CT) G(CT)I (AT)(GC)I GCI TGG (AC)A(CT) GA(CT) AA(CT)-3'; „antisense“-Primer 3*, 5'-CCA ICC IT(AG) ICC (ACGT)G(CG) (AG)AA (AG)AA (AG)TC-3'; je 30 pMol Primer pro 50 µl PCR-Ansatz bei 55°C „annealing“-Temperatur und 45 Zyklen), cDNA-Fragmente von ca. 90 Bp amplifiziert. Nach Gelelektion wurden die Enden der PCR-Produkte repariert (d.h. durch DNA-Polymerase I glatte Enden erzeugt und mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert) und in die *EcoRV*-Schnittstelle von pBSK (Stratagene) kloniert. Die Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Kartoffel und Tabak RT-PCR-Produkte konnte durch Vergleich mit bekannten *GnTI*-Sequenzen zwischen den Primern (Pfeile) als homolog bestätigt werden; \Rightarrow Q(R/M)QFVQDP(D/Y)ALYRS \Leftarrow (homologe As unterstrichen). Von je einem der Klone wurden mittels PCR radioaktiv markierte Sonden synthetisiert (Standard-PCR-Ansatz mit degenerierten Primern wie oben, Nukleotidmischung ohne dCTP, dafür mit 50 µCi α -³²P-dCTP [>3000 Ci/mMol] versetzt) und verschiedene cDNA-Banken mit den entsprechenden homologen Kartoffel- bzw. Tabak-Sonden auf *GntI*-haltige Klone durchgemustert (Vorgehen analog zu Ref. 31; „stringente“ Hybridisierungsbedingungen wurden bereits oben im Text definiert). Die cDNA-Banken wurden mit mRNA aus jungen, noch wachsenden Pflanzenteilen („sink“-Gewebe) hergestellt. Nach cDNA-Synthese und Ligieren von *EcoRI*/*NotI*-Adaptoren (cDNA-Synthese-Kit, Pharmacia) wurde mit *EcoRI*-kompatiblen Lambda-Armen ligiert, diese verpackt und damit *E. coli* XL1-Blue-Zellen trans-

fiziert (Lambda ZAPII Klonierungs- und Verpackungssystem, Strategene). Nach Amplifikation der Banken wurde je ein vollständiger *GntI*-Klon aus einer Kartoffelblatt-"sink"-Bank (A1 gemäß Fig. 2 und SEQ ID NO: 1) und einer Tabakblatt-"sink"-Bank (A9 gemäß SEQ ID NO: 3), sowie zwei weitere Klone aus einer Knollen-"sink"-Bank isoliert (A6, A8). Die abgeleiteten *GnTI*-Aminosäuresequenzen enthalten im Gegensatz zu denen von Tieren eine potentielle N-Glykosylierungsstelle, Asn-X(ohne Pro)-Ser/Thr. Eine der *GntI*-cDNA-Sequenzen aus Knollen trägt vor dem ersten Methionin Stop-Codons in allen drei Leserahmen (A8). Der codierende Bereich ist zu dem längeren Knollenklon (A6) stark homolog (nur 2 As-Austausche), trägt jedoch eine völlig andere 5'-untranslatierte Region. Des weiteren fehlt der für das Golgi-Enzym charakteristische Membrananker, so daß diese *GntI*-Isoform im Cytosol lokalisiert sein könnte. Sequenzvergleiche wurden mithilfe der „gap“- bzw. „pileup“- und „box“-Option des GCG-„software“-Pakets (J Devereux, P Haeberli, O Smithies (1984) Nucl Acids Res 12: 387-395) erstellt und zeigen, daß die abgeleiteten pflanzlichen *GnTI*-Aminosäuresequenzen zu denen aus tierischen Organismen nur 30-40% Identität und 57-59% Ähnlichkeit aufweisen (Fig. 3A), untereinander aber hoch homolog sind (75-90% Identität, Fig. 3B).

Bei *Arabidopsis thaliana* wurde analog vorgegangen, wobei zur Herstellung einer spezifischen Sonde zunächst eine *GnTI*-Teilsequenz durch RT-PCR mit *GntI* „sense“-Primer 4A (5'-ATCGGAAAGCTTGGATCC CCA GTG GC(AG) GCT GTA GTT GTT ATG GCT TGC-3'; HindIII-Schnittstelle unterstrichen, BamHI fett gedruckt) und „antisense“-Primer 3*, wie vorstehend definiert, amplifiziert wurde. Aus einer Phagenbank (Lambda Uni-ZAP) wurde mit dieser Sonde zunächst ein 5'-unvollständiger cDNA-Klon isoliert. Durch Vektor-Insert-PCR wurde das fehlende 5'-Ende aus einer weiteren Bank amplifiziert und über eine unique SpeI-Schnittstelle im 5'-Bereich zu einer vollständigen cDNA-Sequenz zusammengesetzt. Die durch Sequenzierung ermittelte Nukleinsäuresequenz ist in SEQ ID NO: 5 aufgeführt.

Bsp. 2: Funktionelle Komplementierung eines GntI-Defekts mit *GntI*-cDNA bei transienter Expression in Protoplasten der *Arabidopsis thaliana* *cgl*-Mutante.

Ca. 4 Wochen nach Aussaat wurden Protoplasten aus Blättern steril angezogener *cgl*-Mutanten („Nichtfärber“-Pflanzen nach 5 Rückkreuzungen, Ref. 13) isoliert und mit Expressionskonstrukten der vollständigen *GntI*-cDNA-Sequenzen (NotI-cDNA-Fragmente, vgl. Fig. 4) in „sense“- (pA35N-Als bzw. pA35N-A9s) oder „antisense“-Orientierung (pA35N-Alas bzw. pA35N-A9as) transformiert und für 96 Std. bei Raumtemperatur abgedunkelt kultiviert (je 50 µg Plasmid-DNA pro 1 Mio. Protoplasten, PEG-Methode nach Ref. 32). Anschließend SDS-PAGE der Protoplastenextrakte und „Western Blot“-Analyse (analog zu Ref. 13,33) zeigte funktionelle Komplementierung des GntI-Defekts, d.h. „komplexe“ Glykosylierung zahlreicher Proteinbanden bei transienter Expression der Kartoffel Al- und Tabak A9-„sense“-, nicht aber der entsprechenden „antisense“-Konstrukte in Protoplasten der *Arabidopsis cgl*-Mutante (Daten nicht gezeigt).

Bsp. 3: Klonierung der binären Expressionskonstrukte pBin-35-Alas und pBin-35-Al-kurz (vgl. Fig. 4).

In die SalI-Schnittstelle der Polylinkerregion (entspricht pUC18) des pflanzlichen Expressionsvektors pA35 (Ref. 29) wurde nach Auffüllen der Enden ein NotI-Linker eingeführt (pA35N), und die vollständige Al-*GntI*-cDNA (Nukleotide 9 bis 1657, gemäß der cDNA in Fig. 2) über NotI in pA35N inseriert („sense“-Konstrukt pA35N-Als bzw. „antisense“-Konstrukt pA35N-Alas). Die Expressionskassetten der „sense“ bzw. „antisense“-Konstrukte wurden über die terminalen Schnittstellen (NcoI-Schnittstelle aufgefüllt, mit HindIII partial nachverdaut) als ca. 2410 Bp-Fragment isoliert und in die EcoRI- (aufgefüllt) und HindIII-Schnittstellen des binären Vektors pBin19 (Ref. 30) inseriert (= pBin-35-Als bzw. pBin-35-Alas). Durch Fusion mit der ebenfalls aufgefüllten NcoI-Schnittstelle des Fragments wird die EcoRI-Schnittstelle des Vektors regeneriert. Zusätzlich wurde

in einem Standard-PCR-Ansatz („sense“-Primer: KS-Sequenzprimer (Stratagene), verlängert für PCR, 5'-GGC CCC CCC TCG AGG TCG ACG GTA TCG-3'; „antisense“-Primer: 5'-GGGCCTCTAGACTCGAG AGC (CT)AC TAC TCT TCC TTG CTG CTG GCT AAT CTT G-3', XbaI-Schnittstelle unterstrichen, XhoI-Schnittstelle kursiv) bei 50°C „annealing“-Temperatur ein 5'-Fragment der *GntI*-cDNA amplifiziert (Nukleotide 9 bis 261, gemäß der cDNA in Fig. 2 und SEQ ID NO: 1). Das PCR-Produkt wurde mit XbaI (im „antisense“-Primer) und NotI (im 5'-Linker der cDNA) verdaut, als ca. 260 Bp-Fragment isoliert und in pA35N kloniert (= pA35N-A1-kurz). Die Expressionskassette des kurzen „antisense“-Konstrukts wurde als EcoRI/HindIII-Fragment (ca. 1020 Bp) ebenfalls in pBin19 inseriert (= pBin-35-A1-kurz).

Bsp. 4: Transformation von Agrobakterien durch die binären *GntI*-Konstrukte und Regeneration von transgenen Kartoffel- bzw. Tabakpflanzen aus infizierten Blattscheiben.

Die binären „antisense“-*GntI*-Konstrukte (pBin-35-Alas bzw. pBin-35-A1-kurz) wurden in den Agrobakterien-Stamm GV2260 transformiert (Ref. 34,35). Mit den rekombinanten Agrobakterienlinien wurden exemplarisch sterile Blattscheiben von Kartoffelpflanzen der Var. Désirée bzw. Tabakpflanzen der Var. Wisconsin 38 infiziert (50 µl einer frischen Übernachtskultur in 10 ml flüssigem 2MS-Medium: 2% Saccharose in Murashige & Skoog Salz/Vitamin-Standard-Medium, pH 5,6; Blattstückchen ohne Mittelrippen; Cokultivierung 2 Tage dunkel in Pflanzen-Klimakammern). Nach Waschen der infizierten Blattstückchen in 2MS-Medium mit 250 µg/ml Claforan wurden aus diesen in Gewebekultur unter Kanamycin-Selektion transgene Pflanzen regeneriert (Kartoffelprotokoll Ref. 26; Tabakprotokoll Ref. 36) und auf reduzierte *GnTI*-Aktivität getestet (exemplarisch in Fig. 5 für transgene Kartoffelpflanzen gezeigt). Wie aus Fig. 5 ersehen werden kann, war die "antisense"-Suppression komplexer Glykoprotein-Modifikation in der transgenen Kartoffelpflanze #439 erfolgreich. Die festgestellte Drosselung der komplexen Glykoprotein-Modifikation war in dieser Transformante über den ge-

samten Untersuchungszeitraum von mehreren Monaten stabil und wurde in drei, jeweils im Abstand von ca. 1 Monat durchgeführten Tests bestätigt. Analoge Ergebnisse wurden für die entsprechenden transgenen Tabakpflanzen erhalten.

Bsp. 5: Gewinnung von rekombinantem Kartoffel-GnTI-Protein (zur Antikörperproduktion).

Mit Hilfe des pET-Systems (Novagen) wurde rekombinante GnTI mit 10 zusätzlichen N-terminalen Histidin-Resten („His-tag“) in *E. coli* erzeugt und durch Metall-Chelat-Affinitätschromatografie gereinigt. Ein cDNA-Fragment, das die Nukleotide 275-1395 der Kartoffel *GntI*-cDNA umfaßt (entsp. As 75-446, Fig. 2 bzw. SEQ ID NO: 1 und 2), wurde mittels Standard-PCR („annealing“-Temperatur 50°C, 30 Zyklen, Ref. 31) amplifiziert („sense“-Primer *GntI*-5' fus: 5'-CATGGATCC CTC GAG AAG CGT CAG GAC CAG GAG TGC CGG C-3'; „antisense“-Primer *GntI*-3' stop: 5'-ATCCCGGGATCCG CTA CGT ATC TTC AAC TCC AAG TTG-3'; XhoI- bzw. BamHI Schnittstellen unterstrichen, Stop-Codon kursiv), und über die Restriktionsschnittstellen der synthetischen Primer (5'-XhoI-*GntI*-BamHI-3') in den Vektor pET16b (Novagen) inseriert (= pET-His-A1). Nach Vermehrung und Analyse in *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) wurde das Konstrukt als Glycerinkultur archiviert. Zur Überexpression wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen (Novagen) mit pET-His-A1 transformiert. Zugabe von IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid, ad 0,5-2 mM) zu einer logarithmisch wachsenden BL21-Kultur induziert zunächst die Expression von (bakterienchromosomaler) T7-RNA-Polymerase und damit ebenfalls die Expression des rekombinanten Fusionsproteins, das in pET-Vektoren (Novagen) unter T7-Promotor-Kontrolle steht. Aus induzierten BL21:pET-His-A1-Zellen wurde rekombinante Kartoffel-GnTI mit „His-tag“ unter denaturierenden Bedingungen (Hersteller-Protokoll, Novagen) mittels Metall-Chelat-Chromatographie an TALON-Matrix (Clontech) gereinigt und die Präparation mittels SDS-PAGE auf Einheitlichkeit überprüft.

Bsp. 6: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen.

Rekombinante Kartoffel-GnTI (aus Bsp. 5) wurde als Antigen verwendet. Nach Entnahme von einigen Millilitern Prä-Immunserum wurde den Kaninchen in dreiwöchigen Abständen 300-500 µg affinitätsgereinigtes Protein zusammen mit 25 µg GMDP-Adjuvans (Gerbu) subcutan injiziert. Nach drei Basis-Injektionen wurden die Tiere 12 bis 14 Tage nach der jeweiligen Folge-Injektion ("Boost") aus der Ohrvene geblutet, das Serum gewonnen (Ref. 37) und auf Erkennung rekombinanter GnTI in "Western Blot"-Analysen (1:200 bis 1:2000-Verdünnung) getestet. Das Antiserum der "Boosts" mit geringstem Hintergrund-zu-Signal-Verhältnis wurde mit 0,04% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei +4°C bzw. längerfristig bei -20°C gelagert. Wie in Fig. 6 gezeigt, ergaben "Western Blot"-Analysen von Tabak-Kalluszellen (BY-2-Suspensionskultur) ein spezifisches GnTI-Signal in angereicherten Mikrosomenfraktionen, welches anzeigt, daß die gegen das rekombinante Protein hergestellten Antikörper pflanzliche GnTI spezifisch erkennen. Der Nachweis wurde mit angereicherten Mikrosomenfraktionen (ER und Golgi-Vesikel) durchgeführt, da GnTI-Protein, bedingt durch die geringen Mengen, in Pflanzen-Rohextrakten mit der verwendeten "Western-Blot"-Methode nicht nachzuweisen ist.

Referenzen

- 1) R Kornfeld, S Kornfeld (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664
- 2) GP Kaushal, T Szumilo, AD Elbein (1988). Structure and biosynthesis of plant N-linked glycans. In J Preiss (editor) *The Biochemistry of Plants, Vol 14: Carbohydrates*. Academic Press, San Diego, CA, pp 421-463
- 3) L Faye, MJ Chrispeels (1989) Apparent inhibition of β -fructosidase secretion by tunicamycin may be explained by breakdown of the unglycosylated protein during secretion. *Plant Physiol* 89: 845-851

- 4) TW Rademacher, RB Parekh, RA Dwek (1988) Glycobiology. Annu Rev Biochem 57: 785-838
- 5) A Sturm (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of 2 secreted carrot glycoproteins. Eur J Biochem 199: 169-179
- 6) K Olden, BA Bernard, MJ Humphries, T Yeo, SL White, SA Newton, HC Bower, JB Parent (1985) Function of glycoprotein glycans. Trends Biochem Sci 10: 78-82
- 7) P Stanley (1989) Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. Mol Cell Biol 9: 377-383
- 8) R Kumar, J Yang, RD Larsen, P Stanley (1990) Cloning and expression of N-acetylglucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9948-9952
- 9) JW Dennis, S Laferte, C Waghorne, ML Breitman, RS Kerbel (1987) $\beta \rightarrow 6$ branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. Science 236: 582-585
- 10) MN Fukuda (1990) HEMPAS disease: genetic defect of glycosylation. Glycobiology 1: 9-15
- 11) MN Fukuda, KA Masri, A Dell, L Luzzatto, KW Moremen (1990) Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoietic anemia type II caused by a defect in the gene encoding α -mannosidase II. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7443-7447
- 12) M Laurière, C Laurière, MJ Chrispeels, KD Johnson, A Sturm (1989) Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of ex-

tracellular and vacuolar glycoproteins. Plant Physiol 90:
1182-1188

- 13) A von Schaewen, A Sturm, J O'Neill, MJ Chrispeels (1993)
Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks N-acetyl
glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Gol-
gi-modified complex N-linked glycans. Plant Physiol 102:
1109-1118
- 14) JK-C Ma, MB Hein (1995) Plant antibodies for immunotherapy.
Plant Physiol 109: 341-346
- 15) AS Moffat (1995) Medical applications: Exploring transgenic
plants as a new vaccine source. Science 268: 658-660
(Zusammenfassung von zwei Originalveröffentlichungen in
derselben Ausgabe)
- 16) CB Taylor (1997) Comprehending cosuppression. Plant Cell 9:
1245-1249 (Zusammenfassung von mehreren Originalveröffent-
lichungen in derselben Ausgabe)
- 17) M Faske, JE Backhausen, M Sendker, M Singer-Bayrle, R
Scheibe, A von Schaewen (1997) Transgenic tobacco plants
expressing pea chloroplast *Nmdh* cDNA in sense and antisense
orientation: Effects on NADP-MDH level, stability of trans-
formants, and plant growth. Plant Physiol 115: 705-715
- 18) R Koes, E Souer, A van Houwelingen, L Mur, C Spelt, F Quat-
trocchio, J Wing, B Oppedijk, S Ahmed, T Maes, T Gerats, P
Hoogeveen, M Meesters, D Kloos, JNM Mol (1995) Targeted ge-
ne inactivation in petunia by PCR-based selection of trans-
poson insertion mutants. Proc Acad Sci USA 92: 8149-8153
- 19) EC McKinney, N Ali, A Traut, KA Feldmann, DA Belostotsky,
JM McDowell, RB Meagher (1995) Sequence-based identifica-
tion of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mu-
tants *act2-1* and *act4-1*. Plant J 8: 613-622

- 20) F Altmann, G Kornfeld, T Dalik, E Staudacher, J Glössl
(1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-acetylglucosaminyl transferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology* 3: 619-625
- 21) A Sturm, KD Johnson, T Szumilo, AD Elbein, MJ Chrispeels
(1987) Subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of N-linked oligosaccharides. *Plant Physiol* 85: 741-745
- 22) GM Church, W Gilbert (1984) Genomic sequencing. *Proc Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- 23) J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- 24) H Puchta, B Hohn (1996) From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Plant Sci* 1: 340-348
- 25) NW Barton, FS Furbish, GJ Murray, M Garfield, RO Brady
(1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1913-1916
- 26) M Rocha-Sosa, U Sonnewald, W-B Frommer, M Stratmann, J Schell, L Willmitzer (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* 8: 23-29
- 27) T Hildmann, M Ebner, H Pena-Cortes, JJ Sanchez-Serrano, L Willmitzer, S Prat (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170

- 28) KD Johnson, MJ Chrispeels (1987) Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. *Plant Physiol* 84: 1301-1308
- 29) H Höfte, L Faye, C Dickinson, EM Herman, MJ Chrispeels (1991) The protein-body proteins phytohemagglutinin and tonoplast intrinsic protein are targeted to vacuoles in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 184: 431-437
- 30) M Bevan (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl Acids Res* 12: 8711-8721
- 31) K Graeve, A von Schaewen, R Scheibe (1994) Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 5: 353-361
- 32) B Damm, R Schmidt, L Willmitzer (1989) Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet* 213: 15-20
- 33) A von Schaewen, M Stitt, R Schmidt, L Willmitzer (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate, inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 9: 3033-3044
- 34) R Deblaere, B Bytebier, H De Greve, F Debroeck, J Schell, M van Montagu, J Leemans (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl Acids Res* 13: 4777-4788
- 35) R Höfgen, L Willmitzer (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* 16: 9877

- 36) T Voelker, A Sturm, MJ Chrispeels (1987) Differences in expression between two seed lectin alleles obtained from normal and lectin-deficient beans are maintained in transgenic tobacco. EMBO J 6: 3571-3577
- 37) E Harlow, D Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 38) J Sorge, C West, B Westwood, E Beutler (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human cerebrosidase cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7289-7293
- 39) TGM Schmidt, A Skerra (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. Prot Engineering 6: 109-122
- 40) W van der Wilden, NR Gilkes, MJ Chrispeels (1980) The endoplasmic reticulum of mung bean cotyledons: role in the accumulation of hydrolases in protein bodies during seedling growth. Plant Physiol. 66: 390-394

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen und definierten Zuckerresten, umfassend das Züchten einer transgenen Pflanze, von Teilen transgener Pflanzen oder von transformierten Pflanzenzellen und das Isolieren des gesuchten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze, die Teile transgener Pflanzen bzw. die transformierten Pflanzenzellen mit einem „antisense“-Konstrukt oder einem „sense“-Konstrukt, umfassend eine „antisense“-DNA bzw. „sense“-DNA bezüglich der DNA-Sequenz eines Gens oder einer cDNA für pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I oder eines Teils davon, zur Beseitigung oder Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in diesen transformiert ist bzw. sind, wobei das „antisense“- oder „sense“-Konstrukt gegebenenfalls zusätzlich regulatorische Sequenzen für die Transkription der entsprechenden „antisense“- oder „sense“-DNA enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein „antisense“- oder „sense“-Konstrukt bezüglich einer der cDNAs, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* oder *Arabidopsis thaliana* kodieren, verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein „antisense“- oder „sense“-Konstrukt bezüglich einer der in den SEQ. ID. NO. 1, 3 oder 5 angegebenen DNA-Sequenzen verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte transgene Pflanze zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformiert worden ist.

5. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* kodiert.
6. DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 1 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
7. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum* kodiert.
8. DNA nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ. ID. NO. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
9. DNA, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA die in SEQ. ID. NO. 6 angegebene Aminosäuresequenz kodiert oder die in SEQ. ID. NO. 5 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt.
10. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die komplementäre Nukleotidsequenz zu der DNA nach Anspruch 6, 8 oder 9 aufweist.
11. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide und/oder Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende einer der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 10 erhalten werden kann mit der Maßgabe, daß die DNA unter stringenten Bedingungen zumindest in einem Teilabschnitt mit der Ausgangs-DNA oder deren komplementärer Sequenz oder mit Teilen derselben hybridisiert.
12. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gen darstellt oder Teil eines Gens ist, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und über ihre gesamte Länge hinweg oder in einem Teilabschnitt
 - mit einer der DNA-Sequenzen oder -Fragmente nach einem der Ansprüche 5 bis 11 und/oder

- mit einer DNA-Sequenz, die von den in den SEQ ID NO: 1, 3 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist, unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

13. DNA-Konstrukt,

dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 14 umfaßt.

14. DNA-Konstrukt nach Anspruch 13,

dadurch gekennzeichnet, daß es eine „antisense“- oder „sense“-DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 5 bis 12 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der „antisense“- bzw. „sense“-DNA umfaßt.

15. Vektor, Plasmid, Cosmid, Viren- oder Phagengenom,

dadurch gekennzeichnet, daß er oder es zumindest eine DNA und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 14 umfaßt.

16. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum*.

17. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum*.

18. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana*,

dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

19. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet,

daß das Enzym die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

20. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet,

daß das Enzym die Aminosäuren 74 bis 446 der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt.

21. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

22. N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich aufgrund der Hybridisierung ihres Gen oder eines oder mehrerer Abschnitte ihres Gens mit einer oder mehreren der DNAs und/oder DNA-Fragmente gemäß einem der Ansprüche 5 bis 12.

23. Von den Enzymen gemäß einem der Ansprüche 16 bis 22 durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren und/oder durch N- und/oder C-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme oder Proteine.

24. Protein oder Peptid, umfassend einen oder mehrere Abschnitte der Aminosäuresequenz(en) eines oder mehrerer der in einem der Ansprüche 16 bis 23 definierten Enzyme.

25. Protein oder Peptid, welches durch eine der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 12 kodiert wird.

26. Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß es

- die in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz oder
 - die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder
 - eine durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren von den in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz oder
 - einen Teil oder mehrere Teile dieser Sequenzen
- umfaßt mit der Maßgabe, daß das Antigen bei Immunisierung eines Wirtes mit diesem zur Bildung einer immunologischen Reaktion einschließlich der Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern führt.

27. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch eines oder mehrere der Enzyme oder Antigene nach einem der Ansprüche 16 bis 26 erkennt und dieses oder diese bindet.

28. Mikroorganismus,

dadurch gekennzeichnet, daß er durch mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den DNAs, Konstrukten, Vektoren, Plasmiden, Cosmiden, Viren- oder Phagengenomen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 15 transformiert ist.

29. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle, erhältlich durch Integration einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 13 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch Infektion durch ein eine oder mehrere DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 13 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Expression der DNA-Sequenz(en) oder des Konstrukts/der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.

30. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer „antisense“- oder „sense“-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein ein oder mehrere „antisense“- bzw. „sense“-Konstrukt(e) nach Anspruch 14 enthaltendes Virus für eine extrachromosomale Propagation und Transkription von dem oder den „antisense“-Konstrukt(en) oder von dem oder den „sense“-Konstrukt(en) in infiziertem Pflanzengewebe.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft pflanzliche *GntI*-Sequenzen, insbesondere pflanzliche Nukleinsäuresequenzen, die das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) kodieren, davon abgeleitete DNA-Sequenzen einschließlich *GntI*-„antisense“- und „sense“-Konstrukten, und deren Translationsprodukte, gegen diese Translationsprodukte gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der Sequenzinformation zur Gewinnung von transformierten Mikroorganismen und von transgenen Pflanzen, einschließlich solchen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität. Derartige Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität sind zur Herstellung von Glykoproteinen spezifischer Konstitution bezüglich der Zuckerreste von großer Bedeutung.

SEQUENZPROTOKOLL

1c836 U.S. PTO
09/591466
06/09/00

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: von Schaewen, Antje, Dr. rer. nat.
- (B) STRASSE: Natruperstrasse 169a
- (C) ORT: Osnabrück
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 49076
- (G) TELEFON: 0541-684029

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von Glykoproteinen in Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)- Aktivitaet unter Verwendung pflanzlicher gntI- Sequenzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1669 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum
- (B) STAMM: Desiree
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
- (F) GEWEBETYP: Mesophyll
- (G) ZELLTYP: Blattzellen

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
- (B) CLON(E): gntI-A1(K)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

- (B) LAGE:659..667
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine potentielle Glykosylierungsstelle"
/product= "Konsensus Sequenz fuer N-Glykosylierung"
/phenotype= "N-Glykane modulieren Proteineigenschaften"
/standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
/label= pöt-CHO
/note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:53..1393
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 53
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf sekret. Glykoproteinen"
/EC_number= 2.4.1.101
/product= "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "cgl"
/standard_name= "gntI"
/label= ORF
/note= "erste gntI-Sequenz aus Kartoffel (unpubliziert)"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE:15..52

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1394..1655

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:80..139
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker (Aminosäuren 10-29)"
/product= "hydrophober Aminosäurebereich in GnTI"
/standard_name= "Membrananker eines Typ II Golgi-Proteins"
/note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1..14
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung der cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
/product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1656..1669
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| GAATTCGCGG CCGCCTGAGA AACCCCTCGAA TTCAATTTTCG CATTTGGCAG AG ATG | 55 |
| Met | |
| 1 | |
| AGA GGG AAC AAG TTT TGC TTT GAT TTA CGG TAC CTT CTC GTC GTG GCT | 103 |
| Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val Ala | |
| 5 10 15 | |
| GCT CTC GCC TTC ATC TAC ATA CAG ATG CGG CTT TTC GCG ACA CAG TCA | 151 |
| Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser | |
| 20 25 30 | |
| GAA TAT GTA GAC CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA AAT CAT TGT | 199 |
| Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His Cys | |
| 35 40 45 | |
| ACA AGT CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC AAG ATT AGC CAG CAG CAA GGA | 247 |
| Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln Gly | |
| 50 55 60 65 | |
| AGA GTA GTA GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CAT CAG GAC CAG GAG TGC | 295 |
| Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu Cys | |
| 70 75 80 | |
| CGG CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG GGC ATA AAA | 343 |
| Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile Lys | |
| 85 90 95 | |
| AAG TTA ATC GGA GAT GTG CAG ATG CCA GTG GCA GCT GTA GTT GTT ATG | 391 |
| Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met | |
| 100 105 110 | |
| GCT TGC AGT CGT ACT GAC TAC CTG GAG AGG ACT ATT AAA TCC ATC TTA | 439 |
| Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile Leu | |
| 115 120 125 | |
| AAA TAC CAA ACA TCT GTT GCA TCA AAA TAT CCT CTT TTC ATA TCC CAG | 487 |
| Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln | |
| 130 135 140 145 | |
| GAT GGA TCA AAT CCT GAT GTA AGA AAG CTT GCT TTG AGC TAT GGT CAG | 535 |
| Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln | |
| 150 155 160 | |
| CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TAT GAA CCT GTG CAT ACT GAA AGA | 583 |
| Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu Arg | |
| 165 170 175 | |
| CCA GGG GAA CTG GTT GCA TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAT TAC AAG TGG | 631 |
| Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp | |
| 180 185 190 | |
| GCA TTG GAT CAG CTG TTT CAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT GTT ATC ATA | 679 |
| Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile Ile | |
| 195 200 205 | |

| | |
|---|------|
| CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCT GCT GAT TTT TTT GAC TAT TTT GAG Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu 210 215 220 225 | 727 |
| GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG GCT ATT TCT Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile Ser 230 235 240 | 775 |
| TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA AGG CAG TTC GTC CAA GAT CCT GAT GCT Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp Ala 245 250 255 | 823 |
| CTT TAC CGC TCA GAC TTT TTT CCT GGT CTT GGA TGG ATG CTT TCA AAA Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser Lys 260 265 270 | 871 |
| TCA ACT TGG TCC GAA CTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT TAC TGG GAT Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp 275 280 285 | 919 |
| GAC TGG CTA AGG CTG AAA GAA AAT CAC AGA GGT CGA CAA TTT ATT CGC Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile Arg 290 295 300 305 | 967 |
| CCA GAA GTT TGC AGA ACG TAC AAT TTT GGT GAG CAT GGT TCT AGT TTG Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu 310 315 320 | 1015 |
| GGG CAG TTT TTT AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAG CTA AAT GAT GTC Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val 325 330 335 | 1063 |
| CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTA AGT TAC CTT TTG GAG GAC AAC Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp Asn 340 345 350 | 1111 |
| TAT GTG AAA CAC TTT GGC GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG CCC ATC CAC Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile His 355 360 365 | 1159 |
| GGA GCT GAT GCT GTT TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT GAT GTG CGT Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val Arg 370 375 380 385 | 1207 |
| ATT CAG TAC AGA GAC CAA CTA GAC TTT GAA GAT ATC GCT CGA CAG TTT Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln Phe 390 395 400 | 1255 |
| GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGG GCA GCA TAT AAA Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr Lys 405 410 415 | 1303 |
| GGG ATA GTA GTT TTC CGG TTT CAA ACA TCT AGA CGT GTG TTC CTT GTT Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu Val 420 425 430 | 1351 |
| TCC CCT GAT TCT CTT CGA CAA CTT GGA GTT GAA GAT ACT TAG Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr * | 1393 |
| CGAAGATATG ATTGGAGCCT GAGCAACAAT TTAGACTTAT TTGGTAGGAT ACATTTGAAA | 1453 |
| GAGCTGACAC GAAAAGTATG ACTACCAGTA GCTACATGCA ACATTTTAAAT GTTAATGGAA | 1513 |
| GGAACCCACT GCTTATTGTT GGAATGGATG AATCATCACC ACATCCTATT ATTCAAGTTT | 1573 |

ACAAACATAA AGAGGAAATG TTGCCCTATA AAAACAAATT TTTTGTCTTCT AAGAAGGAAC 1633
GTTACGATTA TGAGCAACTT TGGCGGCCGC GAATTC 1669

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 447 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Phe Asp Leu Arg Tyr Leu Leu Val Val
1 5 10 15
Ala Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
20 25 30
Ser Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His
35 40 45
Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln
50 55 60
Gly Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu
65 70 75 80
Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile
85 90 95
Lys Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val
100 105 110
Met Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile
115 120 125
Leu Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser
130 135 140
Gln Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly
145 150 155 160
Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu
165 170 175
Arg Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys
180 185 190
Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile
195 200 205
Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe
210 215 220
Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile
225 230 235 240
Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp
245 250 255

Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser
260 265 270

Lys Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp
275 280 285

Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile
290 295 300

Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser
305 310 315 320

Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp
325 330 335

Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp
340 345 350

Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile
355 360 365

His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val
370 375 380

Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln
385 390 395 400

Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr
405 410 415

Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu
420 425 430

Val Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr *

435 440 445

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1737 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Nicotiana tabacum
 - (B) STAMM: Samsun NN
 - (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: "sink" Organ
 - (F) GEWEBETYP: Mesophyll
 - (G) ZELLTYP: Blattzellen
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (A) BIBLIOTHEK: Lambda ZAP II (EcoRI)
 - (B) CLON(E): gntI-A9(T)

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 733..741
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Asn-Codon ist eine potentielle Glykosylierungsstelle"
/product= "Konsensus Sequenz für N-Glykosylierung"
/phenotype= "N-Glykane modulieren Proteineigenschaften"
/standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
/label= pot-CHO
/note= "fehlt in tierischen GnTI-Sequenzen"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 127..1467
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 127
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf sekret. Glykoproteinen"
/EC_number= 2.4.1.101
/product= "beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "cgl"
/standard_name= "gntI"
/label= ORF
/note= "erste gntI-Sequenz aus Tabak (unpubliziert)"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 15..126

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 1468..1723

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 154..213
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Membrananker (Aminosäuren 10-29)"
/product= "hydrophober Aminosäurebereich in GnTI"
/standard_name= "Membrananker eines Typ II Golgi-Proteins"
/note= "durch Vergleich mit tierischen GnTI-Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1..14
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "zur Herstellung der cDNA-Bank in Lambda ZAP II"
/product= "EcoRI/NotI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1724..1737
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "EcoRI/NotI-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

| | |
|---|-----|
| GAATTCGCGG CCGCCATTGA CTTGATCCTA ACTGAACAGG CAAAGTAAAT CCAGCGATGA | 60 |
| AACACTCATA ACTGAACACT GAGAGACTAT TCGCTTTCTC CTAAAGCCTT CAATCGAATT | 120 |
| CGCACG ATG AGA GGG AAC AAG TTT TGC TGT GAT TTC CGG TAC CTC CTC | 168 |
| Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu | |
| 450 455 460 | |
| ATC TTG GCT GCT GTC GCC TTC ATC TAC ACA CAG ATG CGG CTT TTT GCG | 216 |
| Ile Leu Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Thr Gln Met Arg Leu Phe Ala | |
| 465 470 475 | |
| ACA CAG TCA GAA TAT GCA GAT CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA | 264 |
| Thr Gln Ser Glu Tyr Ala Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu | |
| 480 485 490 | |
| AAT CAT TGT ACA AGC CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC CAG ATT AGC CTG | 312 |
| Asn His Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gln Ile Ser Leu | |
| 495 500 505 | |
| CAG CAA GGA AGA ATA GTT GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CGT CAG GAC | 360 |
| Gln Gln Gly Arg Ile Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys Arg Gln Asp | |
| 510 515 520 525 | |
| CAG GAG TGC CGA CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG | 408 |
| Gln Glu Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys | |
| 530 535 540 | |
| GGC ATA AAA AAG TTG ATC GGA AAT GTA CAG ATG CCA GTG GCT GCT GTA | 456 |
| Gly Ile Lys Lys Leu Ile Gly Asn Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val | |
| 545 550 555 | |
| GTT GTT ATG GCT TGC AAT CGG GCT GAT TAC CTG GAA AAG ACT ATT AAA | 504 |
| Val Val Met Ala Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Lys Thr Ile Lys | |
| 560 565 570 | |
| TCC ATC TTA AAA TAC CAA ATA TCT GTT GCG TCA AAA TAT CCT CTT TTC | 552 |
| Ser Ile Leu Lys Tyr Gln Ile Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe | |
| 575 580 585 | |
| ATA TCC CAG GAT GGA TCA CAT CCT GAT GTC AGG AAG CTT GCT TTG AGC | 600 |
| Ile Ser Gln Asp Gly Ser His Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser | |
| 590 595 600 605 | |
| TAT GAT CAG CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TTT GAA CCT GTG CAT | 648 |
| Tyr Asp Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val His | |
| 610 615 620 | |
| ACT GAA AGA CCA GGG GAG CTG ATT GCA TAC TAC AAA ATT GCA CGT CAT | 696 |
| Thr Glu Arg Pro Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His | |
| 625 630 635 | |

| | |
|---|------|
| TAC AAG TGG GCA TTG GAT CAG CTG TTT TAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT Tyr Lys Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Asn Phe Ser Arg 640 645 650 | 744 |
| GTT ATC ATA CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCC CCT GAT TTT TTT GAC Val Ile Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp 655 660 665 | 792 |
| TTT TTT GAG GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG Phe Phe Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met 670 675 680 685 | 840 |
| GCT ATT TCT TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA ATG CAG TTT GTC CAA GAT Ala Ile Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp 690 695 700 | 888 |
| CCT TAT GCT CTT TAC CGC TCA GAT TTT TTT CCC GGT CTT GGA TGG ATG Pro Tyr Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met 705 710 715 | 936 |
| CTT TCA AAA TCT ACT TGG GAC GAA TTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT Leu Ser Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala 720 725 730 | 984 |
| TAC TGG GAC GAC TGG CTA AGA CTC AAA GAG AAT CAC AGA GGT CGA CAA Tyr Trp Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln 735 740 745 | 1032 |
| TTT ATT CGC CCA GAA GTT TGC AGA ACA TAT AAT TTT GGT GAG CAT GGT Phe Ile Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly 750 755 760 765 | 1080 |
| TCT AGT TTG GGG CAG TTT TTC AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAA CTA Ser Ser Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu 770 775 780 | 1128 |
| AAT GAT GTC CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTT AGT TAC CTT TTG Asn Asp Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu 785 790 795 | 1176 |
| GAG GAC AAT TAC GTG AAA CAC TTT GGT GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG Glu Asp Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys 800 805 810 | 1224 |
| CCC ATC CAT GGA GCT GAT GCT GTC TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT Pro Ile His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly 815 820 825 | 1272 |
| GAT GTG CGT ATT CAG TAC AGA GAT CAA CTA GAC TTT GAA AAT ATC GCA Asp Val Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala 830 835 840 845 | 1320 |
| CGG CAA TTT GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGT GCA Arg Gln Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala 850 855 860 | 1368 |
| GCA TAT AAA GGA ATA GTA GTT TTC CGG TAC CAA ACG TCC AGA CGT GTA Ala Tyr Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val 865 870 875 | 1416 |
| TTC CTT GTT GGC CAT GAT TCG CTT CAA CAA CTC GGA ATT GAA GAT ACT Phe Leu Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr 880 885 890 | 1464 |
| TAA CAAAGATATG ATTGCAGGAG CCCGGGCAAA ATTTTGTACT TATTGGGTAG * | 1517 |

GATGCATCGA GCTGACACTA AACCATGATT TTACCAGTTA CATACAACGT TTTAATGTTA 1577
TACGGAGGAG CTCACGTGTC TAGTGTGAA GGGATATCGG CTTCTTAGTA TTGGATGAAT 1637
CATCAACACA ACCTATTATT TTAAGTGTTC AGAACATAAA GAGGAAATGT AGCCCTGTAA 1697
AGACTATACA TGGGACCATC ATAATCGCGG CCGCGAATTC 1737

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 447 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Gly Asn Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15
Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Thr Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
20 25 30
Ser Glu Tyr Ala Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His
35 40 45
Cys Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Gln Ile Ser Leu Gln Gln
50 55 60
Gly Arg Ile Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys Arg Gln Asp Gln Glu
65 70 75 80
Cys Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile
85 90 95
Lys Lys Leu Ile Gly Asn Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val
100 105 110
Met Ala Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Lys Thr Ile Lys Ser Ile
115 120 125
Leu Lys Tyr Gln Ile Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser
130 135 140
Gln Asp Gly Ser His Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Asp
145 150 155 160
Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val His Thr Glu
165 170 175
Arg Pro Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys
180 185 190
Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile
195 200 205
Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Phe Phe
210 215 220

Glu Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile
 225 230 235 240
 Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Met Gln Phe Val Gln Asp Pro Tyr
 245 250 255
 Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser
 260 265 270
 Lys Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp
 275 280 285
 Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile
 290 295 300
 Arg Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser
 305 310 315 320
 Leu Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp
 325 330 335
 Val Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp
 340 345 350
 Asn Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile
 355 360 365
 His Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val
 370 375 380
 Arg Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asn Ile Ala Arg Gln
 385 390 395 400
 Phe Gly Ile Phe Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr
 405 410 415
 Lys Gly Ile Val Val Phe Arg Tyr Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu
 420 425 430
 Val Gly His Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly Ile Glu Asp Thr *
 435 440 445

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1854 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cdNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Arabidopsis thaliana
 - (B) STAMM: Columbia
 - (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: reife Pflanzen
 - (F) GEWEBETYP: alle Gewebe

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: Lambda Uni-ZAP (EcoRI/XhoI) und
Lambda ACT (XhoI)
- (B) CLON(E): pBSK-Ara-GntI-full #8

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1185..1193
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Asn-Codon ist eine
potentielle Glykosylierungsstelle"
/product= "Konsensus Sequenz fuer
N-Glykosylierung"
/phenotype= "N-Glykane modulieren
Proteineigenschaften"
/standard_name= "N-Glykosylierungsstelle"
/label= pöt-CHO
/note= "fehlt in tierischen GntI-Sequenzen"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:135..1469
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 135
/function= "initiiert komplexe N-Glykane auf
sekret. Glykoproteinen"
/EC_number= 2.4.1.101
/product=
"beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "cgl"
/standard_name= "gntI"
/label= ORF
/note= "erste gntI-Sequenz aus Arabidopsis
(unpubliziert)"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE:19..134

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE:1470..1848

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:157..215
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Membrananker
(Aminosäuren 8-27)"
/product= "hydrophober Aminosäurebereich in
GntI"
/standard_name= "Membrananker eines Typ II
Golgi-Proteins"
/note= "durch Vergleich mit tierischen GntI-
Sequenzen identifiziert"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1..18

(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "zur Herstellung
einer cDNA-Bibliothek in Lambda ACT"
/product= "XhoI-cDNA-Adaptor"
/number= 1

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1849..1854
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "XhoI-cDNA-Adaptor"
/number= 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

| | |
|---|-----|
| CTCGAGGCCA CGAAGGCCAC CGTTTTTGTT ATAACGAACG ACACCGTTTC AAACAACTTC | 60 |
| CTTATTAGCT AGCTCCCTCC CGGCGGCAAA CACCAGAAGA TCCACCGCTT TTGATCTGGT | 120 |
| TGTTTGTCGT CGAT ATG GCG AGG ATC TCG TGT GAC TTG AGA TTT CTT CTC | 170 |
| Met Ala Arg Ile Ser Cys Asp Leu Arg Phe Leu Leu | |
| 1 5 10 | |
| ATC CCG GCA GCT TTC ATG TTC ATC TAC ATC CAG ATG AGG CTT TTC CAG | 218 |
| Ile Pro Ala Ala Phe Met Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Gln | |
| 15 20 25 | |
| ACG CAA TCA CAG TAT GCA GAT CGC CTC AGT TCC GCT ATC GAA TCT GAG | 266 |
| Thr Gln Ser Gln Tyr Ala Asp Arg Leu Ser Ser Ala Ile Glu Ser Glu | |
| 30 35 40 | |
| AAC CAT TGC ACT AGT CAA ATG CGA GGC CTC ATA GAT GAA GTT AGC ATC | 314 |
| Asn His Cys Thr Ser Gln Met Arg Gly Leu Ile Asp Glu Val Ser Ile | |
| 45 50 55 60 | |
| AAA CAG TCG CGG ATT GTT GCC CTC GAA GAT ATG AAG AAC CGC CAG GAC | 362 |
| Lys Gln Ser Arg Ile Val Ala Leu Glu Asp Met Lys Asn Arg Gln Asp | |
| 65 70 75 | |
| GAA GAA CTT GTG CAG CTT AAG GAT CTA ATC CAG ACG TTT GAA AAA AAA | 410 |
| Glu Glu Leu Val Gln Leu Lys Asp Leu Ile Gln Thr Phe Glu Lys Lys | |
| 80 85 90 | |
| GGA ATA GCA AAA CTC ACT CAA GGT GGA CAG ATG CCT GTG GCT GCT GTA | 458 |
| Gly Ile Ala Lys Leu Thr Gln Gly Gly Gln Met Pro Val Ala Ala Val | |
| 95 100 105 | |
| GTG GTT ATG GCC TGC AGT CGT GCA GAC TAT CTT GAA AGG ACT GTT AAA | 506 |
| Val Val Met Ala Cys Ser Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Val Lys | |
| 110 115 120 | |
| TCA GTT TTA ACA TAT CAA ACT CCC GTT GCT TCA AAA TAT CCT CTA TTT | 554 |
| Ser Val Leu Thr Tyr Gln Thr Pro Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe | |
| 125 130 135 140 | |
| ATA TCT CAG GAT GGA TCT GAT CAA GCT GTC AAG AGC AAG TCA TTG AGC | 602 |
| Ile Ser Gln Asp Gly Ser Asp Gln Ala Val Lys Ser Lys Ser Leu Ser | |
| 145 150 155 | |

| | |
|---|------|
| TAT AAT CAA TTA ACA TAT ATG CAG CAC TTG GAT TTT GAA CCA GTG GTC Tyr Asn Gln Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val Val 160 165 170 | 650 |
| ACT GAA AGG CCT GGT GAA CTG ACT GCG TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAC Thr Glu Arg Pro Gly Glu Leu Thr Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His 175 180 185 | 698 |
| TAC AAG TGG GCA CTG GAC CAG TTG TTT TAC AAA CAC AAA TTT AGT CGA Tyr Lys Trp Ala Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Ser Arg 190 195 200 | 746 |
| GTG ATT ATA CTA GAA GAC GAT ATG GAA ATT GCT CCA GAC TTC TTT GAT Val Ile Ile Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp 205 210 215 220 | 794 |
| TAC TTT GAG GCT GCA GCT AGT CTC ATG GAT AGG GAT AAA ACC ATT ATG Tyr Phe Glu Ala Ala Ala Ser Leu Met Asp Arg Asp Lys Thr Ile Met 225 230 235 | 842 |
| GCT GCT TCA TCA TGG AAT GAT AAT GGA CAG AAG CAG TTT GTG CAT GAT Ala Ala Ser Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Lys Gln Phe Val His Asp 240 245 250 | 890 |
| CCC TAT GCG CTA TAC CGA TCA GAT TTT TTT CCT GGC CTT GGG TGG ATG Pro Tyr Ala Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met 255 260 265 | 938 |
| CTC AAG AGA TCG ACT TGG GAT GAG TTA TCA CCA AAG TGG CCA AAG GCT Leu Lys Arg Ser Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala 270 275 280 | 986 |
| TAC TGG GAT GAT TGG CTG AGA CTA AAG GAA AAC CAT AAA GGC CGC CAA Tyr Trp Asp Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Lys Gly Arg Gln 285 290 295 300 | 1034 |
| TTC ATT GCA CCG GAA GTC TGT AGA ACA TAC AAT TTT GGT GAA CAT GGG Phe Ile Ala Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly 305 310 315 | 1082 |
| TCT AGT TTG GGA CAG TTT TTC AGT CAG TAT CTG GAA CCT ATA AAG CTA Ser Ser Leu Gly Gln Phe Phe Ser Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu 320 325 330 | 1130 |
| AAC GAT GTG ACG GTT GAC TGG AAA GCA AAG GAC CTG GGA TAC CTG ACA Asn Asp Val Thr Val Asp Trp Lys Ala Lys Asp Leu Gly Tyr Leu Thr 335 340 345 | 1178 |
| GAG GGA AAC TAT ACC AAG TAC TTT TCT GGC TTA GTG AGA CAA GCA CGA Glu Gly Asn Tyr Thr Lys Tyr Phe Ser Gly Leu Val Arg Gln Ala Arg 350 355 360 | 1226 |
| CCA ATT CAA GGT TCT GAC CTT GTC TTA AAG GCT CAA AAC ATA AAG GAT Pro Ile Gln Gly Ser Asp Leu Val Leu Lys Ala Gln Asn Ile Lys Asp 365 370 375 380 | 1274 |
| GAT GAT CGT ATC CGG TAT AAA GAC CAA GTA GAG TTT GAA CGC ATT GCA Asp Asp Arg Ile Arg Tyr Lys Asp Gln Val Glu Phe Glu Arg Ile Ala 385 390 395 | 1322 |

| | |
|---|------|
| GGG GAA TTT GGT ATA TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTG CCA CGA ACA Gly Glu Phe Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Thr 400 405 410 | 1370 |
| GCA TAT AAA GGA GTA GTG GTG TTT CGA ATC CAG ACA ACA AGA CGT GTA Ala Tyr Lys Gly Val Val Val Phe Arg Ile Gln Thr Thr Arg Arg Val 415 420 425 | 1418 |
| TTC CTG GTT GGG CCA GAT TCT GTA ATG CAG CTT GGA ATT CGA AAT TCC Phe Leu Val Gly Pro Asp Ser Val Met Gln Leu Gly Ile Arg Asn Ser 430 435 440 | 1466 |
| TGA TGCAAAACAT ATGAAAGGAA AAGAAGATTT TGGACCGCAT GCAGCCTCCT * 445 | 1519 |
| TCTAGCAGCT GTTAGGTTGT ATTGTTATTT ATGGATGAGT TTGTAGAGCG GTGGGGTTAA | 1579 |
| CTTTAACAGC AAGGAAGCTC TGGTGACCAG GCTGATTGGC TTAGAAGTTA TGGGAACCCC | 1639 |
| TTGAAAGGGT CAGGGTTAAA TATATTTTCAG TTGTTTTATT AGTGATTATC TTGTGGGTAA | 1699 |
| CTTATACGAA TGCAATCAT TCTATGCAGT TTTTCTTCGT CCCACTTGTT TTGGCTTCTC | 1759 |
| TATTGCTAGT GTACATATCT CTTCAAACAT GTACTAAATA ATGCCGTGTG CTTCAAAGAA | 1819 |
| GTAACTTTTA TTAATAAAAAA AAAAAAAAC TCGAG | 1854 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 445 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

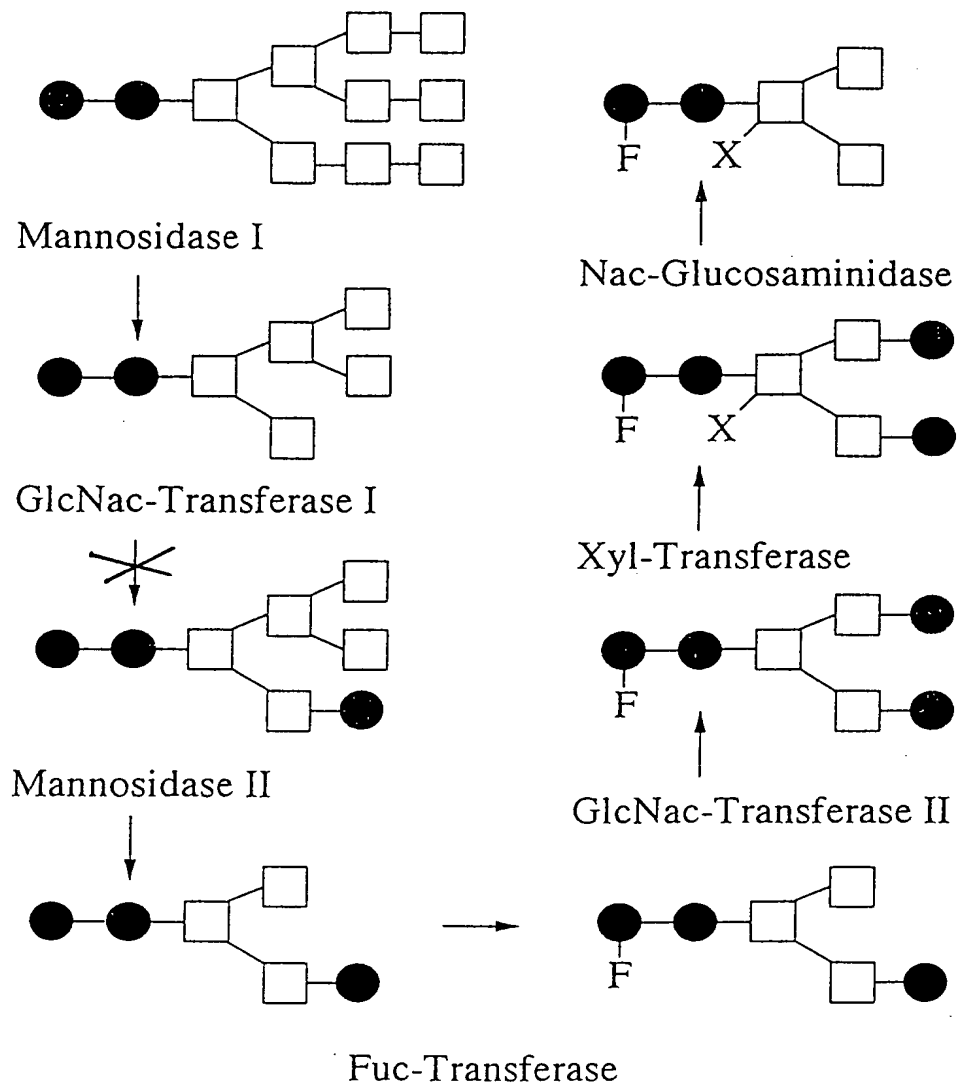
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

| |
|--|
| Met Ala Arg Ile Ser Cys Asp Leu Arg Phe Leu Leu Ile Pro Ala Ala 1 5 10 15 |
| Phe Met Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Gln Thr Gln Ser Gln 20 25 30 |
| Tyr Ala Asp Arg Leu Ser Ser Ala Ile Glu Ser Glu Asn His Cys Thr 35 40 45 |
| Ser Gln Met Arg Gly Leu Ile Asp Glu Val Ser Ile Lys Gln Ser Arg 50 55 60 |
| Ile Val Ala Leu Glu Asp Met Lys Asn Arg Gln Asp Glu Glu Leu Val 65 70 75 80 |
| Gln Leu Lys Asp Leu Ile Gln Thr Phe Glu Lys Lys Gly Ile Ala Lys 85 90 95 |
| Leu Thr Gln Gly Gly Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met Ala 100 105 110 |

Cys Ser Arg Ala Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Val Lys Ser Val Leu Thr
 115 120 125
 Tyr Gln Thr Pro Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln Asp
 130 135 140
 Gly Ser Asp Gln Ala Val Lys Ser Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Leu
 145 150 155 160
 Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Phe Glu Pro Val Val Thr Glu Arg Pro
 165 170 175
 Gly Glu Leu Thr Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp Ala
 180 185 190
 Leu Asp Gln Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Ser Arg Val Ile Ile Leu
 195 200 205
 Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Pro Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu Ala
 210 215 220
 Ala Ala Ser Leu Met Asp Arg Asp Lys Thr Ile Met Ala Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Trp Asn Asp Asn Gly Gln Lys Gln Phe Val His Asp Pro Tyr Ala Leu
 245 250 255
 Tyr Arg Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Lys Arg Ser
 260 265 270
 Thr Trp Asp Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp Asp
 275 280 285
 Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Lys Gly Arg Gln Phe Ile Ala Pro
 290 295 300
 Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu Gly
 305 310 315 320
 Gln Phe Phe Ser Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Trp Lys Ala Lys Asp Leu Gly Tyr Leu Thr Glu Gly Asn Tyr
 340 345 350
 Thr Lys Tyr Phe Ser Gly Leu Val Arg Gln Ala Arg Pro Ile Gln Gly
 355 360 365
 Ser Asp Leu Val Leu Lys Ala Gln Asn Ile Lys Asp Asp Asp Arg Ile
 370 375 380
 Arg Tyr Lys Asp Gln Val Glu Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Phe Gly
 385 390 395 400
 Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Thr Ala Tyr Lys Gly
 405 410 415
 Val Val Val Phe Arg Ile Gln Thr Thr Arg Arg Val Phe Leu Val Gly
 420 425 430

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Asp | Ser | Val | Met | Gln | Leu | Gly | Ile | Arg | Asn | Ser | * |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 |

Figur 1



2 / 6

| | | | | | | | | | |
|---|---|--------------------|------------------------|-------------|----|-----|-----|---|-----|
| GAATTCGCGG | CCGCCTGAGA | AACCCTCGAA | TTCAATTTTCG | CATTTGGCAG | AG | ATG | Met | 1 | 55 |
| AGA GGG AAC AAG TTT TGC TTT GAT TTA CGG TAC CTT CTC GTC GTG GCT | Arg Gly Asn Lys 5 | Phe Cys Phe Asp 10 | Leu Arg Tyr Leu Leu 15 | Val Val Ala | | | | | 103 |
| GCT CTC GCC TTC ATC TAC ATA CAG ATG CGG CTT TTC GCG ACA CAG TCA | Ala Leu Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser | 20 | 25 | 30 | | | | | 151 |
| GAA TAT GTA GAC CGC CTT GCT GCT GCA ATT GAA GCA GAA AAT CAT TGT | Glu Tyr Val Asp Arg Leu Ala Ala Ala Ile Glu Ala Glu Asn His Cys | 35 | 40 | 45 | | | | | 199 |
| ACA AGT CAG ACC AGA TTG CTT ATT GAC AAG ATT AGC CAG CAG CAA GGA | Thr Ser Gln Thr Arg Leu Leu Ile Asp Lys Ile Ser Gln Gln Gln Gly | 50 | 55 | 60 | | | | | 247 |
| AGA GTA GTA GCT CTT GAA GAA CAA ATG AAG CAT CAG GAC CAG GAG TGC | Arg Val Val Ala Leu Glu Glu Gln Met Lys His Gln Asp Gln Glu Cys | 70 | 75 | 80 | | | | | 295 |
| CGG CAA TTA AGG GCT CTT GTT CAG GAT CTT GAA AGT AAG GGC ATA AAA | Arg Gln Leu Arg Ala Leu Val Gln Asp Leu Glu Ser Lys Gly Ile Lys | 85 | 90 | 95 | | | | | 343 |
| AAG TTA ATC GGA GAT GTG CAG ATG CCA GTG GCA GCT GTA GTT GTT ATG | Lys Leu Ile Gly Asp Val Gln Met Pro Val Ala Ala Val Val Val Met | 100 | 105 | 110 | | | | | 391 |
| GCT TGC AGT CGT ACT GAC TAC CTG GAG AGG ACT ATT AAA TCC ATC TTA | Ala Cys Ser Arg Thr Asp Tyr Leu Glu Arg Thr Ile Lys Ser Ile Leu | 115 | 120 | 125 | | | | | 439 |
| AAA TAC CAA ACA TCT GTT GCA TCA AAA TAT CCT CTT TTC ATA TCC CAG | Lys Tyr Gln Thr Ser Val Ala Ser Lys Tyr Pro Leu Phe Ile Ser Gln | 130 | 135 | 140 | | | | | 487 |
| GAT GGA TCA AAT CCT GAT GTA AGA AAG CTT GCT TTG AGC TAT GGT CAG | Asp Gly Ser Asn Pro Asp Val Arg Lys Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln | 150 | 155 | 160 | | | | | 535 |
| CTG ACG TAT ATG CAG CAC TTG GAT TAT GAA CCT GTG CAT ACT GAA AGA | Leu Thr Tyr Met Gln His Leu Asp Tyr Glu Pro Val His Thr Glu Arg | 165 | 170 | 175 | | | | | 583 |
| CCA GGG GAA CTG GTT GCA TAC TAC AAG ATT GCA CGT CAT TAC AAG TGG | Pro Gly Glu Leu Val Ala Tyr Tyr Lys Ile Ala Arg His Tyr Lys Trp | 180 | 185 | 190 | | | | | 631 |
| GCA TTG GAT CAG CTG TTT CAC AAG CAT AAT TTT AGC CGT GTT ATC ATA | Ala Leu Asp Gln Leu Phe His Lys His Asn Phe Ser Arg Val Ile Ile | 195 | 200 | 205 | | | | | 679 |
| CTA GAA GAT GAT ATG GAA ATT GCT GCT GAT TTT TTT GAC TAT TTT GAG | Leu Glu Asp Asp Met Glu Ile Ala Ala Asp Phe Phe Asp Tyr Phe Glu | 210 | 215 | 220 | | | | | 727 |

Figur 2 (Fortsetzung)

| | |
|--|------|
| GCT GGA GCT ACT CTT CTT GAC AGA GAC AAG TCG ATT ATG <u>GCT ATT TCT</u> | 775 |
| Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Arg Asp Lys Ser Ile Met Ala Ile Ser | |
| 230 235 240 | |
| <u>TCT TGG AAT GAC AAT GGA CAA AGG CAG TTC GTC CAA GAT CCT GAT GCT</u> | 823 |
| Ser Trp Asn Asp Asn Gly Gln Arg Gln Phe Val Gln Asp Pro Asp Ala | |
| 245 250 255 | |
| CTT TAC CGC TCA <u>GAC TTT TTT CCT GGT CTT GGA TGG</u> ATG CTT TCA AAA | 871 |
| Leu Tyr Ser Asp Phe Phe Pro Gly Leu Gly Trp Met Leu Ser Lys | |
| 260 265 270 | |
| TCA ACT TGG TCC GAA CTA TCT CCA AAG TGG CCA AAG GCT TAC TGG GAT | 919 |
| Ser Thr Trp Ser Glu Leu Ser Pro Lys Trp Pro Lys Ala Tyr Trp Asp | |
| 275 280 285 | |
| GAC TGG CTA AGG CTG AAA GAA AAT CAC AGA GGT CGA CAA TTT ATT CGC | 967 |
| Asp Trp Leu Arg Leu Lys Glu Asn His Arg Gly Arg Gln Phe Ile Arg | |
| 290 295 300 305 | |
| CCA GAA GTT TGC AGA ACG TAC AAT TTT GGT GAG CAT GGT TCT AGT TTG | 1015 |
| Pro Glu Val Cys Arg Thr Tyr Asn Phe Gly Glu His Gly Ser Ser Leu | |
| 310 315 320 | |
| GGG CAG TTT TTT AAG CAG TAT CTT GAG CCA ATT AAG CTA AAT GAT GTC | 1063 |
| Gly Gln Phe Phe Lys Gln Tyr Leu Glu Pro Ile Lys Leu Asn Asp Val | |
| 325 330 335 | |
| CAG GTT GAT TGG AAG TCA ATG GAC CTA AGT TAC CTT TTG GAG GAC AAC | 1111 |
| Gln Val Asp Trp Lys Ser Met Asp Leu Ser Tyr Leu Leu Glu Asp Asn | |
| 340 345 350 | |
| TAT GTG AAA CAC TTT GGC GAC TTG GTT AAA AAG GCT AAG CCC ATC CAC | 1159 |
| Tyr Val Lys His Phe Gly Asp Leu Val Lys Lys Ala Lys Pro Ile His | |
| 355 360 365 | |
| GGA GCT GAT GCT GTT TTG AAA GCA TTT AAC ATA GAT GGT GAT GTG CGT | 1207 |
| Gly Ala Asp Ala Val Leu Lys Ala Phe Asn Ile Asp Gly Asp Val Arg | |
| 370 375 380 385 | |
| ATT CAG TAC AGA GAC CAA CTA GAC TTT GAA GAT ATC GCT CGA CAG TTT | 1255 |
| Ile Gln Tyr Arg Asp Gln Leu Asp Phe Glu Asp Ile Ala Arg Gln Phe | |
| 390 395 400 | |
| GGC ATT TTT GAA GAA TGG AAG GAT GGT GTA CCA CGG GCA GCA TAT AAA | 1303 |
| Gly Ile Phe Glu Glu Trp Lys Asp Gly Val Pro Arg Ala Ala Tyr Lys | |
| 405 410 415 | |
| GGG ATA GTA GTT TTC CGG TTT CAA ACA TCT AGA CGT GTG TTC CTT GTT | 1351 |
| Gly Ile Val Val Phe Arg Phe Gln Thr Ser Arg Arg Val Phe Leu Val | |
| 420 425 430 | |
| TCC CCT GAT TCT CTT CGA CAA CTT GGA GTT GAA GAT ACT TAG | 1393 |
| Ser Pro Asp Ser Leu Arg Gln Leu Gly Val Glu Asp Thr End | |
| 435 440 445 | |
| CGAAGATATG ATTGGAGCCT GAGCAACAAT TTAGACTTAT TTGGTAGGAT ACATTTGAAA | 1453 |
| GAGCTGACAC GAAAAGTATG ACTACCAGTA GCTACATGCA ACATTTTAAT GTTAATGGAA | 1513 |
| GGAACCCACT GCTTATTGTT GGAATGGATG AATCATCACC ACATCCTATT ATTCAAGTTT | 1573 |
| ACAAACATAA AGAGGAAATG TTGCCCTATA AAAACAAATT TTTTGTTTCT AAGAAGGAAC | 1633 |
| GTTACGATTA TGAGCAACTT TGGCGGCCGC GAATTC | 1669 |

Figur 3A

4/6

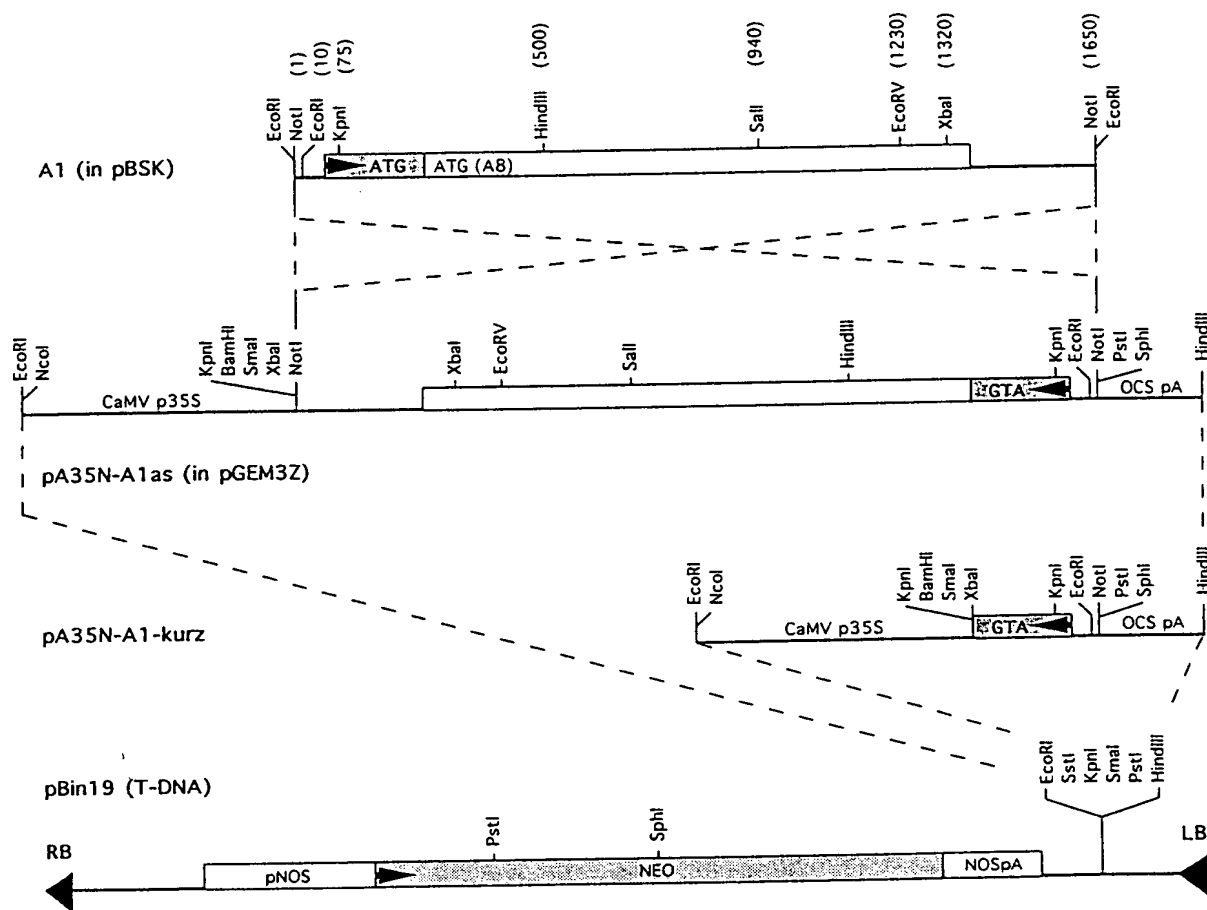
| Hu | Ra | Mo | Ce | |
|------------|------------|------------|------------|----|
| 35 (59) | 36 (57) | 35 (59) | 33 (57) | St |
| | 92 (95) | 91 (94) | 38 (57) | Hu |
| | | 90 (93) | 38 (57) | Ra |
| | | | 38 (58) | Mo |

Figur 3B

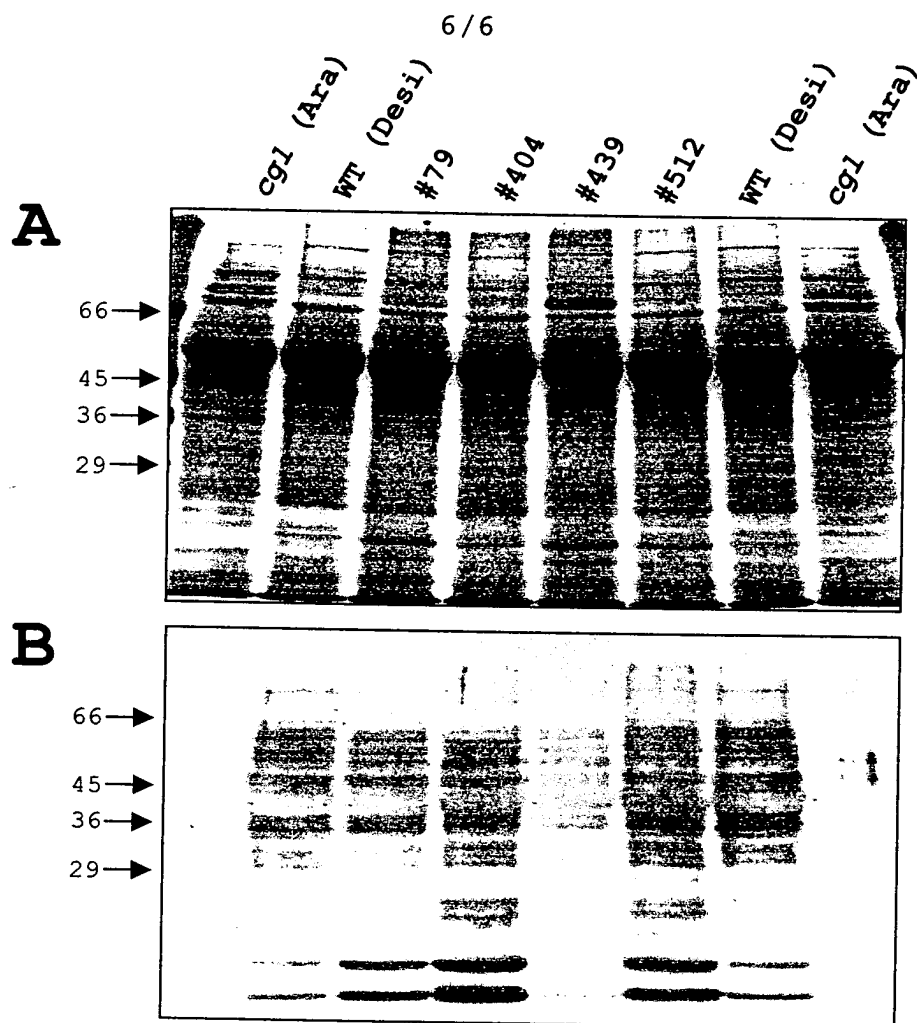
| | | |
|------------|-----|---|
| A_Stb-A1 | 1 | M R G N K F C F D L R Y L L V A A F A F I Y I Q M R L F A T O S E Y V D R L A A A I E A E N H C T |
| B_Ntb-A9 | 1 | M R G N K F C C D F R Y L L I F A A F A F I Y I Q M R L F A T O S E Y A D R L A A A I E A E N H C T |
| C_At看-Full | 1 | .. M A F I S C D L R L L I P A A F M F I Y I Q M R L F Q T O S Q Y A D R L S S A I E S E N H C T |
| A_Stb-A1 | 51 | S Q T R L L I D K I S O O G R M V A L E E Q M K E O D O E C R O L R A L V O D L E S K G I K K L I |
| B_Ntb-A9 | 51 | S Q T R L L I D O I S H O O G R I V A L E E Q M K R O D O E C R O L R A L V O D L E S K G I K K L I |
| C_At看-Full | 49 | S Q M R G L I D E V S E L K O S R I V A L E E M K N R O D E L V O L K D L I O T F E K K G I A K L T |
| A_Stb-A1 | 101 | G D V O M P V A A V V M A C S R D Y L E R T I K S I L K Y Q T S V A S K Y P L F I S O D G S N P |
| B_Ntb-A9 | 101 | G N V O M P V A A V V M A C N R A D Y L E K T I K S I L K Y Q I S V A S K Y P L F I S O D G S H P |
| C_At看-Full | 99 | Q G G Q M P V A A V V M A C S R A D Y L E R T M K S M L T Y O T P V A S K Y P L F I S O D G S D Q |
| A_Stb-A1 | 151 | D V R K L A L S Y G O L T Y M O H L D E F V H T E R P G E L M A Y Y K I A R H Y K W A L D O L F E |
| B_Ntb-A9 | 151 | D V R K L A L S Y D O L T Y M O H L D F E P V H T E R P G E L M A Y Y K I A R H Y K W A L D O L F Y |
| C_At看-Full | 149 | A V K S K S L S Y N O L T Y M O H L D F E P V V T E R P G E L T A Y Y K I A R H Y K W A L D O L F Y |
| A_Stb-A1 | 201 | K H N F S R V I I L E D D M E I A A D F F D Y F E A G A T L L D R D K S I M A I S S W N D N G O R O |
| B_Ntb-A9 | 201 | K H N F S R V I I L E D D M E I A P D F F D F E A G A T L L D R D K S I M A I S S W N D N G O M O |
| C_At看-Full | 199 | K H K F S R V I I L E D D M E I A P D F F D Y F E A N A S L M D R D K T I M A A S S W N D N G O K O |
| A_Stb-A1 | 251 | F V Q D E D A L Y R S D F F P G L G W M L S K S T W S E L S P K W P K A Y W D D W L R L K E N H R G |
| B_Ntb-A9 | 251 | F V Q D P Y A L Y R S D F F P G L G W M L S K S T W D E L S P K W P K A Y W D D W L R L K E N H R G |
| C_At看-Full | 249 | F V H D P Y A L Y R S D F F P G L G W M L K E S T W D E L S P K W P K A Y W D D W L R L K E N H K G |
| A_Stb-A1 | 301 | R Q F I R P E V C R T Y N F G E H G S S L G O F F K O Y L E P I K L N D V Q V D W K S M D L S Y L L |
| B_Ntb-A9 | 301 | R Q F I R P E V C R T Y N F G E H G S S L G O F F K O Y L E P I K L N D V Q V D W K S M D L S Y L L |
| C_At看-Full | 299 | R Q F I A P E V C R T Y N F G E H G S S L G O F F S O Y L E P I K L N D V T V D W K A K D L G Y L T |
| A_Stb-A1 | 351 | E D N Y V K H F G D L V K K A K P I H G A D A V L K A F N I D G D V R I Q Y R D O L D F E N I A R O |
| B_Ntb-A9 | 351 | E D N Y V K H F G D L V K K A K P I H G A D A V L K A F N I D G D V R I Q Y R D O L D F E N I A R O |
| C_At看-Full | 349 | E G N Y T K Y F S G L V E Q A R P I Q G S D L V L K A O N I K D D D R I R Y K D O W E F E R I A G E |
| A_Stb-A1 | 401 | F G I F E E W K D G V P R A A Y K G I V V F R I Q T S R R V F L V S P D S L R Q L G V E D T |
| B_Ntb-A9 | 401 | F G I F E E W K D G V P R A A Y K G I V V F R I Q T S R R V F L V G H D S L Q O L G I E D T |
| C_At看-Full | 399 | F G I F E E W K D G V P R A Y K G V V F R I Q T S R R V F L V G P D S M O L G I R N S |

Figur 4

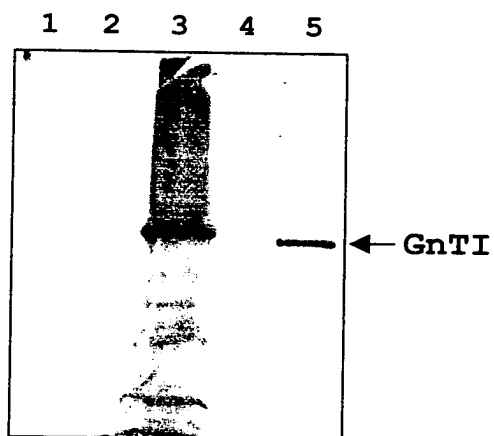
5/6



Figur 5



Figur 6



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPYWUESTHOFF & WUESTHOFF
PATENT- UND RECHTSANWÄLTE
(PCT Rule 24.2(a))

18. MRZ. 1999

To:

WIBBELMANN, Jobst
Wuesthoff & Wuesthoff
Schweigerstrasse 2
D-81541 Muenchen
ALLEMAGNE

| | |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year) 05 March 1999 (05.03.99) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference EP-81 607PCT ✓ | International application No. PCT/EP98/08001 ✓ |

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

VON SCHAEWEN, Antje (all designated States) ✓

International filing date : 09 December 1998 (09.12.98) ✓
 Priority date(s) claimed : 09 December 1997 (09.12.97) ✓
 Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 19 February 1999 (19.02.99)
 List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE ✓
 National : AU, CA, JP, US ✓

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☐ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

| | |
|--|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer: N. Fischer Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|--|

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

| | |
|--|-------------|
| Vom Anmeldeamt auszufüllen | |
| PCT/EP 98 / 08001 | |
| Internationales Aktenzeichen | |
| (09.12.1998) | 09 DEC 1998 |
| Internationales Anmeldedatum | |
| EUROPEAN PATENT OFFICE PCT INTERNATIONAL APPLICATION | |
| Name des Anmeldeamts und "PCT International Application" | |
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) EP-81 607 PCT | |

EP/EP

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG Pflanzliche GntI-Sequenzen und Verwendung derselben zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GntI)-Aktivität

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

von SCHAEWEN, Antje
Natruper Straße 169a
49076 Osnabrück
[Deutschland] (DE)

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:



nur Anmelder



Anmelder und Erfinder



nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

WIBBELMANN, Jobst
WUESTHOFF & WUESTHOFF
Schweigerstraße 2
81541 München
De[utschland]

Telefonnr.:

089 / 62 18 00-0

Telefaxnr.:

089 / 62 18 00-15

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehten.)

| Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH | | <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. | | |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr) | Aktenzeichen der früheren Anmeldung | Ist die frühere Anmeldung eine: | | |
| | | ationale Anmeldung: Staat | regionale Anmeldung: regionales Amt | internationale Anmeldung: Anmeldeamt |
| Zeile (1) (09.12.97) 9. Dezember 1997 | 197 54 622.6 | (DE) Deutschland | | |
| Zeile (2) | | | | |
| Zeile (3) | | | | |

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA / EPA

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Aktenzeichen

Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 3
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 41
Ansprüche : 5
Zusammenfassung : 1
Zeichnungen : 6
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 17
Blattzahl insgesamt : 73

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
- ☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht folgt
- ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
- ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
- ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: folgt
- ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
- ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
- ☒ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
- ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):


Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:

Deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, den 9. Dezember 1998


Dr. Jobst Wibbelmann
European Patent Attorney

Vom Anmeldeamt auszufüllen

| | | | |
|--|-------------|---|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: | 09 DEC 1998 | (- 9. 12. 98) | 2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen: |
| 3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung: | | | |
| 4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT: | | | |
| 5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): | ISA / | 6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PATENT COOPERATION TREATY

WUESTHOFF & WUESTHOFF
PATENT-UND RECHTSANWÄLTE

PCT 18. MAR. 1999

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WIBBELMANN, Jobst
Wuesthoff & Wuesthoff
Schweigerstrasse 2
D-81541 Muenchen
ALLEMAGNE1c836 U.S. PTO
09/591466

| | |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year) 05 March 1999 (05.03.99) | |
| Applicant's or agent's file reference EP-81 607PCT ✓ | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/EP98/08001 ✓ | International filing date (day/month/year) 09 December 1998 (09.12.98) |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 09 December 1997 (09.12.97) |
| Applicant VON SCHAEWEN, Antje ✓ | |

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt of priority document</u> |
|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| 09 Dece 1997 (09.12.97) ✓ | 197 54 622.6 ✓ | DE ✓ | 19 Febr 1999 (19.02.99) |

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

N. Fischer

Telephone No. (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

1c836 U.S. PTO
09/591466
06/09/00

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
WUESTHOFF & WUESTHOFF
z.H. Jobst Wibbelmann
Schweigerstrasse 2
D-81541 München
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

WUESTHOFF & WUESTHOFF
PATENT-UND RECHTSANWÄLTE

10. MAI 1999

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

07/05/1999

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

EP-81 607PCT

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08001

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

09/12/1998

Anmelder

VON SCHAEWEN, Antje

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90^{bis} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sandra De Jong-van Dam

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts EP-81 607PCT | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/ 08001 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09/12/1998 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/12/1997 |
| Anmelder VON SCHAEWEN, Antje | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N9/10 C07K16/40 C12N1/00 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | WO 92 09694 A (HSC RES DEV LP) 11. Juni 1992 siehe das ganze Dokument --- | 6,8-15, 22-28 |
| A | GOMEZ L AND CHRISPEELS M J: "Complementation of an Arabidopsis thaliana mutant that lacks complex asparagine-linked glycans with the human cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase I" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, Bd. 91, Januar 1994, Seiten 1829-1833, XP002100921 siehe das ganze Dokument --- -/-- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. April 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | <p>SCHAEWEN VON A ET AL: "ISOLATION OF A MUTANT ARABIDOPSIS PLANT THAT LACKS N-ACETYL GLUCOSAMINYL TRANSFERASE I AND IS UNABLE TO SYNTHESIZE GOLGI- MODIFIED COMPLEX N-LINKED GLYCANS" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 102, Nr. 4, August 1993, Seiten 1109-1118, XP000645269 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----</p> | |

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 98/08001

| | | | | | |
|------------|---|------------|----|-----------|------------|
| W0 9209694 | A | 11-06-1992 | AU | 8941191 A | 25-06-1992 |
|------------|---|------------|----|-----------|------------|

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WIBBELMANN, Jobst
Wuesthoff & Wuesthoff
Schweigerstrasse 2
D-81541 München
ALLEMAGNE

(PCT Rule 47.1(c), first sentence) 25. JUNI 1999
PATENT-UND RECHTSANWÄLTE

| | | | |
|---|---|---|--|
| Date of mailing (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99) | | 25. JUNI 1999 | |
| Applicant's or agent's file reference EP-81 607PCT | | IMPORTANT NOTICE | |
| International application No. PCT/EP98/08001 ✓ | International filing date (day/month/year) 09 December 1998 (09.12.98) ✓ | Priority date (day/month/year) 09 December 1997 (09.12.97) ✓ | |
| Applicant VON SCHAEWEN, Antje ✓ | | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, EP, JP, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 17 June 1999 (17.06.99) under No. WO 99/29879

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

| | |
|---|---------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer J. Zahra |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |

Continuation of Form PCT/IB/308

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

| | |
|---|--|
| Date of mailing (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99) | IMPORTANT NOTICE |
| Applicant's or agent's file reference EP-81 607PCT | International application No. PCT/EP98/08001 |
| <p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p> | |

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird und benennt hiermit als ausgewählte Staaten
alle auswählbaren Staaten (soweit nichts anderes angegeben).

_____ Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen _____

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Bezeichnung der IPEA | Eingangsdatum des ANTRAGS |
|----------------------|---------------------------|

| | | |
|--|---|--|
| Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG | | Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts EP-81607/PCT |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08001 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) (09.12.98) 9. Dezember 1998 | (Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) (09.12.97) 9. Dezember 1997 |
| Bezeichnung der Erfindung Pflanzliche GntI-Sequenzen und Verwendung derselben zur Gewinnung von Pflanzen mit verminderter oder fehlender N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnTI)-Aktivität | | |
| Feld Nr. II ANMELDER | | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) von SCHAEWEN, Antje Natruper Straße 169a 49076 Osnabrück DE | | Telefonnr.: |
| | | Telefaxnr.: |
| | | Fernschreibnr.: |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) | | |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) | | |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): | |
| <input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben. | | |

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFTDie folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreterund ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

WIBBELMANN, Jobst
WUESTHOFF & WUESTHOFF
Schweigerstraße 2
81541 München
DE

Telefonnr.:

089/ 62 18 00-0

Telefaxnr.:

089/ 62 18 00-15

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.**Feld Nr. IV GRUNDLAGE DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG****Erklärung betreffend Änderungen:***

1. Der Anmelder wünscht, daß die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung
der Beschreibung ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34der Patentansprüche ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 19
(ggf. zusammen mit Begleitschreiben)
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34der Zeichnungen ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34
aufgenommen wird.2. ☐ Der Anmelder wünscht, daß jegliche nach Artikel 19 eingereichte Änderung der Ansprüche als überholt angesehen wird.3. ☐ Der Anmelder wünscht, daß der Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum **aufgeschoben wird**, sofern die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 Absatz d). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Sprache für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung: Deutsch ;☒ dies ist die Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wurde.☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde.☐ dies ist die Sprache der Veröffentlichung der internationalen Anmeldung.☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht wurde/wird.**Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN**

Der Anmelder benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II gebunden sind)

mit Ausnahme der folgenden Staaten, die der Anmelder **nicht benennen möchte**:

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung in der in Feld Nr. IV angegebenen Sprache bei:

- | | | |
|--|---|---------|
| 1. Übersetzung der internationalen Anmeldung | : | Blätter |
| 2. Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Begleitschreiben | : | Blätter |
| 6. Sonstige (einzeln auflühren) | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung | 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift |
| 2. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll in computerlesbarer Form |
| 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): | 6. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln auflühren): |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, den 6. Juli 1999



Dr. Jobst Wibbelmann
European Patent Attorney

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1 Absatz b: | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

WUESTHOFF & WUESTHOFF
PATENT- UND RECHTSANWÄLTEEinge-
gangen

20. Sep. 1999

To:

WIBBELMANN, Jobst
Wuesthoff & Wuesthoff
Schweigerstrasse 2
D-81541 München
Re
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

07 September 1999 (07.09.99)

Applicant's or agent's file reference

EP-81 607PCT ✓

IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/EP98/08001 ✓

International filing date (day/month/year)

09 December 1998 (09.12.98) ✓

Priority date (day/month/year)

09 December 1997 (09.12.97) ✓

Applicant

VON SCHAEWEN, Antje ✓

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE ✓

National : AU, CA, JP, US ✓

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Jean-Marie McAdams

Telephone No. (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

WIBBELMANN, Jobst
WUSETHOFF & WUESTHOFF
Schweigerstrasse 2
D-81541 München
ALLEMAGNE

WUESTHOFF & WUESTHOFF
PATENT- UND RECHTSANWÄLTE

16. FEB. 2000

95

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

14.02.00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
EP-81 607PCT

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP98/08001

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
09/12/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
09/12/1997

Anmelder
VON SCHAEWEN, Antje

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**
Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Vullo, C

Tel. +49 89 2399-8061





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts EP-81 607PCT | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08001 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09/12/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/12/1997 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82 | | |
| Anmelder VON SCHAEWEN, Antje | | |
| <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.</p> | | |
| <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung | | |
| Datum der Einreichung des Antrags 06/07/1999 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 14.02.00 | |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | | Bevollmächtigter Bediensteter Burkhardt, P Tel. Nr. +49 89 2399 7456  |

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/08001

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-41 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-24 eingegangen am 19/01/2000 mit Schreiben vom 19/01/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | 1 - 17, 21 - 24 |
| | Nein: Ansprüche | 18 - 20 |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | 1 - 17, 20 - 24 |
| | Nein: Ansprüche | 21 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1 - 24 |
| | Nein: Ansprüche | |

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die mit dem Brief vom 19.01.2000 eingereichten Änderungen genügen den Erfordernissen des Artikels 34(2)(b) PCT.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen. Ihre Numerierung der im internationalen Recherchenbericht angegebenen Reihenfolge:

- D1 WO-A-9209694 (HSC Research)
- D2 Gomez and Chrispeels, 1994. Plant Biol. 91:1829-1833.

1. Artikel 33(2) (3) PCT (Neuheit und erfinderische Tätigkeit)

2.1 Der vorliegende Anspruch 1 bezieht sich auf ein Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit "minimalen, einheitlichen und definierten" Zuckerresten in transgenen Pflanzen. Die Pflanzen werden dabei mit sense- oder antisense-cDNA einer pflanzlichen N-Acetylglucosaminyltransferase I transformiert, um die Aktivität des besagten Enzyms zu verringern oder zu beseitigen.

2.2 Das beanspruchte Verfahren wurde im Stand der Technik so wie er der IPEA momentan zu Verfügung steht, weder offenbart noch nahegelegt. Anspruch 1 erscheint deshalb neu und erfinderisch im Sinne des Artikels 33(2) (3) PCT. Dies gilt auch für die abhängigen Ansprüche 2 - 4.

2.3 Die Ansprüche 5, 6 und 7 beziehen sich auf die DNA einer N-Acetylglucosaminyltransferase I (*Gntl*) aus *Solanum*, *Nicotiana* beziehungsweise *Arabidopsis*. Die betreffenden DNA Sequenzen (SEQ ID NOs 1, 3 und 5) wurden

im Stand der Technik wie er der IPEA zur Verfügung steht weder offenbart noch wurde ihre Isolierung nahegelegt. Die Ansprüche 5, 6 und 7 genügen den Erfordernissen des Artikels 33(2) (3) PCT. Dies gilt auch für die abhängigen Ansprüche 8 - 10 sowie für die Ansprüche 11 - 17 und 22 - 24. Besagte Ansprüche beziehen sich auf DNA-Konstrukte mit den beanspruchten *Gntl* Sequenzen, transgene Pflanzen und Mikroorganismen, die diese Sequenzen enthalten sowie auf die entsprechenden Proteine (SEQ ID NOs 2, 4 und 6).

2.4 Der vorliegende Anspruch 18 bezieht sich auf eine N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich über Hybridisierung ihrer komplette DNA Sequenz oder von Teilsequenzen mit den Ansprüchen 5 - 10 offenbarten Sequenzen (SEQ ID NOs 1, 3 und 5).

2.5 Dokument D1 (Seiten 9-13) offenbart DNA Sequenzen, die für eine tierische und eine humane N-Acetylglucosaminyltransferase I codieren und die mit den oben genannten Sequenzen zwischen 56% und 56,7% identisch sind. Bestimmte Teile der DNA aus D1 sind sogar zu 100% identisch mit den oben genannten Sequenzen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die in D1 offenbarten Sequenzen zumindest in einem oder mehreren Abschnitten mit den in den Ansprüchen 5 - 10 offenbarten Sequenzen (SEQ ID NOs 1, 3 und 5) hybridisieren. Anspruch 18 genügt deshalb nicht den Erfordernissen des Artikels 33(2) PCT.

Dies gilt auch für den abhängigen Anspruch 19 sowie für den Anspruch 20, da sich die in D1 offenbarten N-Acetylglucosaminyltransferasen durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleiner Gruppen von Aminosäuren, von den N-Acetylglucosaminyltransferasen der Anmeldung ableiten lassen.

2.6 Der vorliegende Anspruch 21 genügt nicht den Erfordernissen des Artikels 33(3) PCT. Der Gegenstand des Anspruches umfasst Antikörper von bekannten Proteinen (siehe 2.5). Die Erzeugung von Antikörpern bekannter Proteine ist für einen Fachmann offensichtlich und umfasst keine erfinderische Tätigkeit.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die in Anspruch 1 verwendeten Ausdrücke "... Glykoproteine mit **minimalen**, einheitlichen und **definierten** Zuckerresten, ..." erscheinen unklar im Sinne des Artikels 6 PCT. Im Zusammenhang mit den erwähnten Glykoproteinen wird nicht ersichtlich was **minimale** oder **definierte** Zuckerreste sind. Es handelt sich bei diesen Begriffen nicht um technische Eigenschaften, die den Gegenstand des Anspruchs 1 eindeutig definieren könnten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Glykoproteinen mit minimalen, einheitlichen GlcNAc₂Man₅-Resten, umfassend das Züchten einer transgenen Pflanze, von Teilen transgener Pflanzen oder von transformierten Pflanzenzellen und das Isolieren des gesuchten Glykoproteins aus dem gezüchteten Material dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze, die Teile transgener Pflanzen bzw. die transformierten Pflanzenzellen mit einem „antisense“-Konstrukt oder einem „sense“-Konstrukt, umfassend eine „antisense“-DNA bzw. „sense“-DNA bezüglich der DNA-Sequenz eines Gens oder einer cDNA für pflanzliche N-Acetylglucosaminyltransferase I oder eines Teils davon, zur Beseitigung oder Verringerung der N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität in diesen transformiert ist bzw. sind, wobei das „antisense“- oder „sense“-Konstrukt gegebenenfalls zusätzlich regulatorische Sequenzen für die Transkription der entsprechenden „antisense“- oder „sense“-DNA enthält.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein „antisense“- oder „sense“-Konstrukt bezüglich einer der cDNAs, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* oder *Arabidopsis thaliana* kodieren, verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein „antisense“- oder „sense“-Konstrukt bezüglich einer der in den SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 angegebenen DNA-Sequenzen verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte transgene Pflanze zusätzlich mit dem das gesuchte Glykoprotein kodierenden Gen transformiert worden ist.

5. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Solanum tuberosum* kodiert und die in SEQ ID NO: 1 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
6. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Nicotiana tabacum* kodiert und die in SEQ ID NO: 3 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
7. DNA, die N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz kodiert oder die in SEQ ID NO: 5 angegebene Nukleotidsequenz umfaßt.
8. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die komplementäre Nukleotidsequenz zu der DNA nach Anspruch 5, 6 oder 7 aufweist.
9. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide und/oder Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende einer der DNAs nach einem der Ansprüche 5 bis 8 erhalten werden kann mit der Maßgabe, daß die DNA unter stringenten Bedingungen mit der Ausgangs-DNA oder deren komplementärer Sequenz hybridisiert.
10. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Gen darstellt oder Teil eines Gens ist, das das Enzym N-Acetylglucosaminyltransferase I kodiert, und
 - mit einer der DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 5 bis 9 und/oder
 - mit einer DNA-Sequenz, die von den in den SEQ ID NO: 1, 3 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet worden ist,unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
11. DNA-Konstrukt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10 umfaßt.

12. DNA-Konstrukt nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es eine „antisense“- oder „sense“-DNA bezüglich der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 5 bis 10 und ggf. regulatorische Sequenzen für die Transkription der „antisense“- bzw. „sense“-DNA umfaßt.

13. Vektor, Plasmid, Cosmid, Viren- oder Phagengenom, dadurch gekennzeichnet, daß er oder es zumindest eine DNA und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 12 umfaßt.

14. N-Acetylglucosaminyltransferase I aus *Arabidopsis thaliana*, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

15. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

16. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die Aminosäuren 74 bis 446 der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Aminosäuresequenz umfaßt.

17. N-Acetylglucosaminyltransferase I, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt.

18. N-Acetylglucosaminyltransferase I, zugänglich aufgrund der Hybridisierung ihres Gen oder eines oder mehrerer Abschnitte ihres Gens mit einer oder mehreren der DNAs gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10.

19. Von den Enzymen gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18 durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren

GEÄNDERTES BLATT

und/oder durch N- und/oder C-terminale Verkürzung und/oder Verlängerung abgeleitete Enzyme oder Proteine.

20. Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß es

- die in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz oder
- die Aminosäuren 74 bis 446 der in Fig. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder
- eine durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifikation einzelner Aminosäuren und/oder kleinerer Gruppen von Aminosäuren von den in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz

umfaßt mit der Maßgabe, daß das Antigen bei Immunisierung eines Wirtes mit diesem zur Bildung einer immunologischen Reaktion einschließlich der Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern führt.

21. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er spezifisch eines oder mehrere der Enzyme oder Antigene nach einem der Ansprüche 14 bis 20 erkennt und dieses oder diese bindet.

22. Mikroorganismus,

dadurch gekennzeichnet, daß er durch mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den DNAs, Konstrukten, Vektoren, Plasmiden, Cosmiden, Viren- oder Phagengenomen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 13 transformiert ist.

23. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle, erhältlich durch Integration einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 11 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch Infektion durch ein eine oder mehrere DNA-Sequenz(en) oder Konstrukt(e) nach einem der Ansprüche 5 bis 11 enthaltendes Virus für eine extrachromosoma-

le Propagation und Expression der DNA-Sequenz(en) oder des Konstrukts/der Konstrukte in infiziertem Pflanzengewebe.

24. Transgene Pflanze, transgener Samen, transgenes Vermehrungsmaterial, Teile transgener Pflanzen oder transformierte Pflanzenzelle mit fehlender oder verminderter N-Acetylglucosaminyltransferase I-Aktivität, erhältlich durch Integration eines oder mehrerer „antisense“- oder „sense“-Konstrukt(e) nach Anspruch 12 unter Kontrolle eines in Pflanzen wirksamen Promotors in das Genom einer Pflanze oder durch virale Infektion durch ein ein oder mehrere „antisense“- bzw. „sense“-Konstrukt(e) nach Anspruch 12 enthaltendes Virus für eine extra-chromosomale Propagation und Transkription von dem oder den „antisense“-Konstrukt(en) oder von dem oder den „sense“-Konstrukt(en) in infiziertem Pflanzengewebe.